

**PHOSPHATTRANSLOKATOR IN CHLOROPLASTEN:
IDENTIFIZIERUNG DES TRANSPORTPROTEINS UND
CHARAKTERISIERUNG DER SUBSTRATBINDUNGSSTELLE**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von
ULF-INGO FLÜGGE
aus
Aachen

München

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552314_0010

**PHOSPHATTRANSLOKATOR IN CHLOROPLASTEN:
IDENTIFIZIERUNG DES TRANSPORTPROTEINS UND
CHARAKTERISIERUNG DER SUBSTRATBINDUNGSSTELLE**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians Universität München

vorgelegt von
ULF-INGO FLÜGGE
aus
Aachen

München

1978



1. Berichterstatter : Prof.Dr. H.W.Heldt
 2. Berichterstatter : Prof.Dr. G.Hartmann
- Tag der mündlichen Prüfung : 21.11.1978

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Januar 1975 bis Mai 1978 am Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie der Ludwig-Maximilians Universität München (Vorstände: Prof.Dr.Dr.h.c. Th.Bücher - Prof.Dr. E.M.Klingenberg - Prof.Dr. W.F.Miller - Prof.Dr. H.G.Zachau) durchgeführt.

Die Arbeit entstand auf Vorschlag und unter der Anleitung von Herrn Prof.Dr. H.W.Heldt, dem ich für zahlreiche Anregungen und sein kritisches Interesse an dieser Arbeit herzlich danke. Herrn Prof.Dr. E.M.Klingenberg und den Mitarbeitern seines Lehrstuhl, insbesondere Herrn Dr. H.Aquila, danke ich für wertvolle Diskussionsbeiträge.

Ferner danke ich Fräulein M.Freisl und Frau Dr. C.J.Chon für ihre engagierte Mitarbeit.

Der Studienstiftung des Deutschen Volkes, die mich durch ein zweijähriges Promotionsstipendium unterstützte, bin ich ebenfalls zu Dank verpflichtet.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	Seite
1.1.	Allgemeine Bemerkungen zur Markierung von Membranproteinen	1
1.2.	Die Bedeutung des Phosphattranslokators für die CO ₂ -Fixierung	5
1.3.	Zielsetzung der Arbeit	6
2.	METHODEN	
2.1.	Isolierung der Chloroplasten, Inkubationsbedingungen, Messung der CO ₂ -Fixierung	8
2.2.	Technik der Silikonölfiltrationszentrifugation	8
2.2.1.	Meßtechnik	8
2.2.2.	Aufarbeitung der Proben	9
2.2.3.	Bestimmung der Räume	9
2.2.4.	Berechnung der Substrataufnahme in den sorbitimpermeablen Raum	10
2.3.	Ionenaustauschchromatographie zur Bestimmung der Metabolite im Chloroplasten	11
2.4.	Isolierung, Markierung und Analyse der Hüllmembranen	12
2.4.1.	Isolierung der Hüllmembranen	12
2.4.2.	Markierung der Hüllmembranpolypeptide mit [³⁵ S] Diazobenzoesulfonsäure (DABS), Pyridoxal 5'-phosphat (PLP)/[³ H]NaBH ₄ , 2,4,6-Trinitrobenzoesulfonsäure (TNBS)/[³ H]NaBH ₄ und [³ H]N-Äthylmaleinimid (NEM)	15
2.4.3.	Analyse der Hüllmembranpolypeptide mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-DAGE)	16
2.4.4.	Bestimmung von Molekulargewichten	16
3.	ERGEBNISSE	
3.1.	Isolierung und Charakterisierung der Hüllmembranen mittels SDS-Polyacrylamid Gel-	17

	elektrophorese (SDS-PAGE)	
3.1.1.	Isolierung und Charakterisierung	17
3.1.2.	Analyse der Hüllmembranproteine mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
3.2.	Der Phosphattranslokator und SH-Reagenzien	23
3.2.1.	Hemmung des Phosphattransports durch SH- Reagenzien	23
3.2.2.	Funktion und Lokalisation der SH-Gruppe	28
3.2.3.	Markierung der Hüllmembran mit $[^3\text{H}]\text{NEM}$	31
3.3.	Untersuchungen mit p-Diazobenzoessulfon- säure (DABS)	39
3.3.1.	Einfluß von DABS auf den Phosphattransport	39
3.3.2.	Markierung der Hüllmembran mit $[^{35}\text{S}]\text{DABS}$	43
3.4.	Der Phosphattranslokator und der Einfluß von lysin- und argininspezifischen Inhi- bitoren	46
3.4.1.	Experimente mit Pyridoxal 5'-phosphat (PLP) und Pyridoxal (PAL)	46
3.4.1.1.	Einfluß auf den Phosphattransport	46
3.4.1.2.	Die Markierung der Hüllmembran mit Pyri- doxal 5'-phosphat und Pyridoxal	59
3.4.1.3.	Der Einfluß von Pyridoxal 5'-phosphat auf die CO_2 -Fixierung	65
3.4.2.	Experimente mit 2,4,6-Trinitrobenzoe- sulfonsäure	72
3.4.3.	Experimente mit argininspezifischen Rea- genzien	78
3.4.4.	Der Einfluß von Inhibitoren des Phosphat- translokators auf den Einbau von Pyrido- xal 5'-phosphat, 2,4,6-Trinitrobenzoe- sulfonsäure und Pyridoxal in das 29 000 Dalton Membranpolypeptid	84
4.	DISKUSSION	
4.1.	Isolierung und Charakterisierung der Hüll- membranen	91
4.2.	Der Phosphattransport unter dem Einfluß	92

	Seite
amino säure spezifischer Reagenzien	
4.3. Funktion und Lokalisation der reaktiven Aminosäurereste	97
4.3.1. Vorbemerkungen	97
4.3.2. Funktion und Lokalisation der SH-Gruppe	98
4.3.3. Funktion und Lokalisation des Lysin- und Argininrestes	101
4.4. Identifizierung des Phosphattranslokators	103
4.4.1. Vorbemerkungen	103
4.4.2. Markierung der Hüllmembran mit $[^3\text{H}]\text{NEM}$	104
4.4.3. Markierung der Hüllmembran mit $[^{35}\text{S}]\text{Di-azobenzo esulfonsäure, Pyridoxal 5'-phosphat/}$ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ und 2,4,6-Trinitrobenzo esulfonsäure/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$	106
4.4.4. Zur Asymmetrie der Hüllmembran	109
4.4.5. Proteinchemische Daten des Phosphattranslokators	110
5. ZUSAMMENFASSUNG	113
6. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	116
7. LITERATURVERZEICHNIS	117

1. EINLEITUNG

1.1. Allgemeine Bemerkungen zur Markierung von Membranproteinen

Die beiden Hauptbestandteile biologischer Membranen sind Proteine und Lipide. Ihre molekulare Anordnung in der Membran ist nicht einheitlich, sondern abhängig von ihrer physiologischen Aktivität.

Die Proteine haben eine entscheidende Bedeutung für die Gestaltung der Struktur und für die physiologische Aktivität biologischer Membranen. Sie können nach Singer (1974) in periphere und integrale Membranproteine eingeteilt werden. Die peripheren Proteine liegen der Membran nur an, und ihre Bindung an die die Membran aufbauende Lipiddoppelschicht geschieht über elektrostatische Wechselwirkungen. Im Gegensatz dazu reichen die integralen Proteine in die Lipiddoppelschicht hinein bzw. durch sie hindurch. Diese Proteine werden durch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Lipidschicht gebunden.

Eine biologische Membran ist für hydrophile Moleküle, insbesondere Ionen, mehr oder minder impermeabel. Um diese Permeabilitätsschranke zu überbrücken, ist die Membran mit substratspezifischen Transportmechanismen (Carriern, Translokatoren) ausgestattet, die den Stoffaustausch zwischen Zellinnern und -äußern durch einen trägervermittelten Transport gewährleisten.

Das bestuntersuchte Beispiel ist der mitochondriale ATP/ADP Translokator, dessen Solubilisierung und Isolierung von

Riccio et al.(1975 a,b) beschrieben wurde. Kürzlich gelang es, das isolierte Protein in Liposomen einzubauen und die Transportaktivität teilweise zu rekonstituieren (Krämer und Klingenberg 1977 a,b, Krämer et al. 1977).

Doch sind bislang erst wenige integrale Membranproteine in ihrem funktionellen Zustand isoliert und gereinigt worden. Der Grund hierfür ist, daß zur Auflösung der Membran Detergenzien eingesetzt werden müssen, durch die die meisten Membranproteine inaktiviert werden. Ein Transportprotein verliert durch den notwendigen Einsatz von Detergenzien oft die Bindungsfähigkeit für sein Substrat und entzieht sich somit den Möglichkeiten seiner späteren funktionellen Charakterisierung. Weiterhin ist für die Isolierung einer Membrankomponente ihre Identifizierung Voraussetzung, d.h. die Aktivität muß einem bestimmten Membranprotein zugeordnet werden können.

Eine Möglichkeit zur Identifizierung einer Membrankomponente besteht im Einsatz von Reagenzien, die direkt mit der Membran reagieren.

Da Transportproteine für ihr Substrat von der Außenseite zugänglich sein müssen, sind sie - jedenfalls während des Zeitraumes der Substraterkennung und -bindung - auch für diese Reagenzien zugänglich. Will man nur die Außenseite der Membran markieren, müssen an das Reagenz folgende Anforderungen gestellt werden (siehe auch Maddy 1964):

1. Es sollte für die Membran impermeabel sein. Dies ist für eine Anzahl von Reagenzien, die neben ihrer aktiven Gruppe auch noch einen hydrophilen geladenen Phosphat- oder

Sulfonsäurerest tragen, in mehr oder weniger ausgeprägter Weise der Fall.

Eine lange Inkubationsdauer und eine Temperatur, die über der für die Membran spezifischen Übergangstemperatur liegt, begünstigen jedoch in jedem Fall die Permeabilität auch dieser Reagenzien.

2. Es sollte mit den Aminosäureresten der Membranproteine bezüglich pH, Temperatur und Ionenstärke unter physiologischen Bedingungen reagieren. Eine Anzahl aus der Proteinchemie bekannter Reagenzien wie Diazoniumsalze (z.B. Diazobenzoessulfonsäure, die mit Histidin, Tyrosin, Cystein und Lysin reagiert), Aldehyde (z.B. Pyridoxal 5'-phosphat, das spezifisch für Lysin-Reste ist) und Quecksilberverbindungen (z.B. p-(Chlormercuri)-benzoessulfonsäure, ein SH-Reagenz) erfüllen diese Bedingung.

3. Sie sollten - als Inhibitoren eingesetzt - nach Möglichkeit spezifisch mit nur dem betreffenden Membranprotein reagieren, zudem irreversibel, um während der Aufarbeitungsprozedur so als "Marker" dienen zu können.

Die Analyse der solubilisierten Membran und die Lokalisierung des markierten Proteins geschähe dann mit Hilfe einer sich anschließenden SDS-Polyacrylamid Elektrophorese.

4. Der Marker muß in kleinster Konzentration wieder auffindbar sein, was durch den Einsatz hochmarkierter radioaktiver Substanzen gegeben ist.

Bei den eingesetzten Reagenzien handelt es sich meist um Inhibitoren, die durch die Bindung an bestimmte Regionen

des Proteins eine Hemmung einer enzymatischen Reaktion bzw. im Fall eines Transportproteins des Translokationsschrittes bewirken. Der Inaktivierungsschritt kann hervorgerufen werden durch

- a) einen Angriff auf das aktive Zentrum, wobei unter dem aktiven Zentrum ein spezieller Teil des Proteins verstanden wird, der für die Spezifität der Substratbindung und für die katalytische Aktivität des Proteins verantwortlich ist.
- b) eine Reaktion mit Aminosäureresten, die nicht an der Katalyse beteiligt und außerhalb des aktiven Zentrums lokalisiert sind, wobei durch sterische oder elektrostatische Veränderung indirekt ein Einfluß auf die Bindung der Substrate im aktiven Zentrum ausgeübt wird.

Durch Schutzeffekte der Substrate vor dem Angriff des Inhibitors kann zwischen diesen beiden Möglichkeiten differenziert und gezeigt werden, ob die betreffenden Gruppen direkt an der Substratbindungsstelle lokalisiert sind.

Wie bereits ausgeführt, sollten die Inhibitoren möglichst spezifisch für einen Aminosäurerest sein. Eine Anzahl aminosäurespezifischer Reagenzien werden in der Literatur beschrieben, doch sind die Angaben über die Spezifität mit Vorbehalt zu betrachten. Es ist möglich, daß ein Aminosäurerest an einer bestimmten Stelle im Protein auf Grund des Einflusses der Nachbargruppen eine gegenüber dem gleichen Rest in anderer Position oder in einfacheren Molekülen veränderte Reaktivität aufweist. Trotz gegebener Einschränkungen bleibt festzuhalten, daß der Einsatz von aminosäurespe-

zifischen Inhibitoren eine der besten Möglichkeiten ist, um die Natur eines aktiven Zentrums aufzuklären.

1.2. Die Bedeutung des Phosphattranslokators für die CO_2 -Fixierung

Der Chloroplast wird von einem doppelten Membransystem, der äußeren und der inneren Hüllmembran umschlossen, welches den Stromaraum vom Cytosol abgrenzt. Durch ein im Inneren des Chloroplasten vorhandenes weiteres Membransystem, die Thylakoide, wird der Thylakoidraum umschlossen. Während die äußere Hüllmembran, wie im Fall der äußeren Mitochondrienmembran, für niedermolekulare Substanzen frei permeabel ist, ist die innere Hüllmembran für solche Substanzen strikt impermeabel und stellt eine funktionelle Permeabilitätsschranke zwischen Stroma und Cytosol dar (Heldt und Sauer 1971).

Der Chloroplast ist der Ort der lichtabhängigen CO_2 -Fixierung, die in eine Licht- und eine Dunkelreaktion getrennt werden kann. Die Lichtreaktion ist an das Thyla-

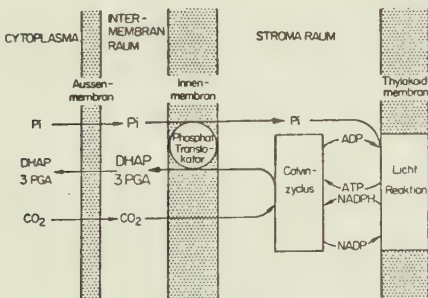


Abb. 1 Metabolische Funktion des Phosphattranslokators

koidmembransystem gebunden und umfaßt die Hill-Reaktion (Photolyse des Wassers, Bildung von O_2 und $NADPH_2$) und die Photophosphorylierung. In der Dunkelreaktion werden durch die löslichen Enzyme des Stromaraumes die Produkte der Lichtreaktion, $NADPH_2$ und ATP, zur Reduktion von CO_2 zu Kohlenhydraten verbraucht (Calvin Zyklus). Dies geschieht über die Reduktion des Primärproduktes der CO_2 -Fixierung, 3-Phosphoglycerat, zu den Triosephosphaten Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat. Die Triosephosphate gelten als Vorstufen zum Aufbau der Saccharose im Cytosol. Sie müssen also über die Hüllmembran in das Cytosol transportiert werden. Dieser Transport wird durch den Phosphattranslokator katalysiert (Heldt und Rapley 1970). Neben den Triosephosphaten wird auch 3-Phosphoglycerat transportiert und im striktem Gegentausch zum Austransport dieser Metabolite wird Phosphat in den Stromaraum hineintransportiert. Auf diese Weise wird die Gesamtmenge an Phosphat und phosphorylierten Verbindungen im Stromaraum konstant gehalten (Lilley et al. 1977). Als Verbindungsglied zwischen Stromaraum und dem Cytosol nimmt der Phosphattranslokator also eine Schlüsselstellung im Stoffwechsel der Chloroplasten ein.

1.3. Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die Bedeutung und die Funktion des Phosphattranslokators für den Chloroplastenstoffwechsel hinreichend dokumentiert wurde, gab es bislang keine Untersuchungen zur biochemischen Charakterisierung dieses Transportsystems.

Die vorliegende Arbeit sollte klären

- a) welcher Proteinkomponente der Hüllmembran die Aktivität des Phosphattranslokators zugewiesen werden kann und
- b) welche Gruppen im aktiven Zentrum des Translokators für die Substratbindung verantwortlich sind.

Ausgangspunkt für eine aussichtsreiche Bearbeitung dieser Fragestellung war die Überlegung, daß die Hüllmembran - im Vergleich zur Mitochondrienmembran - relativ einfach strukturiert sein mußte. In der Mitochondrienmembran sind neben den metabolischen Transportproteinen noch die Enzyme des Elektronentransports und der oxidativen Phosphorylierung lokalisiert, wohingegen beim Chloroplasten die Enzyme des Elektronentransports und der Photophosphorylierung an das von der Hüllmembran getrennte Thylakoidmembransystem gebunden sind.

2. METHODEN

2.1. Isolierung der Chloroplasten, Inkubationsbedingungen, Messung der CO₂-Fixierung

Um ein qualitativ gleichbleibendes Arbeitsmaterial zur Verfügung zu haben, wurde Spinat aus eigener Züchtung verwendet. Die Isolierung der Chloroplasten erfolgte nach der Methode von Cockburn et al. (1968), modifiziert nach Heldt und Sauer (1971). Nach der Isolierung wurden die Chloroplasten in folgendem Medium aufgenommen: 0.33 M Sorbit, 50 mM 2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-piperazinyl-(1)]-äthansulfonsäure (HEPES) pH 7.6, 1 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂ und 2 mM EDTA. Die Menge an Chloroplasten wurde auf den Chlorophyllgehalt bezogen, der nach der Methode von Whatley und Arnon (1963) bestimmt wurde. Die Intaktheit der Präparation wurde quantitativ über die ferricyanidabhängige Sauerstoffentwicklung (Heber und Santarius 1970), und die Raten der CO₂-Fixierung über den bei der Reaktion gebildeten Sauerstoff polarographisch bestimmt. Das Gesamtvolumen betrug jeweils 1000 µl, wobei 100 µl Chlorophyll eingesetzt wurden. Die Chloroplasten wurden durch eine Wolfram Halogenlampe, ausgestattet mit einem RG 630 Filter (Fa. Schott, Mainz) und einem Calflex Hitzefilter (Fa. Balzers, Lichtenstein) mit einer Intensität von 60 W/m² bei 20 °C belichtet.

2.2. Technik der Silikonölfiltrationszentrifugation

2.2.1. Meßtechnik

Die Silikonölfiltrationszentrifugation, von Klingenberg

und Pfaff (1967) entwickelt, wurde mit einer Beckman Mikro- zentrifuge in 0.4 ml Polypropylenröhrchen durchgeführt. Die Röhrchen wurden schichtweise mit 20 μ l 1M HClO_4 , 70 μ l Silikonöl (Wacker Chemie, München AR 150) und 200-300 μ l Chloroplastensuspension (ca 0.1 mg Chl./ml) gefüllt. Der Transportvorgang wurde durch Zugabe von radioaktivem Substrat gestartet und durch Zentrifugation beendet. Die Chloroplasten wurden innerhalb von 1-2 Sekunden nach Beginn der Zentrifugation vom Medium getrennt und in der Perchlorsäure denaturiert. Die Zentrifuge erreichte innerhalb von einer Sekunde ihre volle Geschwindigkeit von 12000 U/min. Sollte der Einfluß von Inhibitoren des Phosphattransports untersucht werden, wurden die Chloroplasten vorher mit den angegebenen Konzentrationen des Inhibitors für die angegebene Zeit inkubiert.

2.2.2. Aufarbeitung der Proben

Zur Messung der Radioaktivität wurden 50 μ l des Überstandes gezählt. Für die Messung der Aktivität im Sediment wurde die Spitze des Röhrchens knapp über der HClO_4 Schicht abgeschnitten, in ein mit 300 μ l H_2O gefülltes Mikroreagiergefäß (1.5 ml Fa. Netheler und Hinz, Hamburg) gegeben, maschinell geschüttelt und zentrifugiert. 200 μ l des Überstandes wurden zur Radioaktivitätsmessung entnommen.

2.2.3. Bestimmung der Räume

Die Bestimmung des Sorbitraumes und des sorbitimpermeablen

Raumes erfolgte mittels $[^{14}\text{C}]$ Sorbit und $[^3\text{H}]\text{H}_2\text{O}$.

Die Berechnungen basieren auf der Messung des Anteils des radioaktiven Überstandes (in μl), der sich nach der Zentrifugation im Sediment befindet. Bezieht man den erhaltenen Wert auf die eingesetzte Menge Chloroplasten (in mg Chl.), so erhält man den Sorbit- bzw. Wasserraum in $\mu\text{l}/\text{mg Chl.}$

$$\text{Raum} = \frac{\text{dpm im Sediment} \cdot \text{Volumen Überstand}}{\text{dpm im Überstand} \cdot \text{mg Chl./Probe}}$$

Der Wasserraum umfaßt das gesamte Chloroplastenvolumen und den Anteil des mitgerissenen Mediums, während der Sorbitraum aus dem Volumen des bei der Zentrifugation mitgerissenen Mediums und dem Volumen des Intermembranraumes besteht. Der sorbitimpermeable Raum, auf den die Substrataufnahme bezogen wird, besteht somit aus der Differenz von Wasser - Sorbitraum.

2.2.4. Berechnung der Substrataufnahme in den sorbitimpermeablen Raum

Bei der Berechnung der Aufnahme eines radioaktiv markierten Substrats in den sorbitimpermeablen Raum wird die im Sorbitraum vorliegende Radioaktivität von der Gesamtaktivität im Sediment substrahiert. Die Division der Sedimentsaktivität durch die spezifische Aktivität (dpm/nMol) und die eingesetzte Chlorophyllmenge (in mg) ergibt die in den sorbitimpermeablen Raum aufgenommene Menge in nMol/mg Chl.. Eine weitere Division durch den Wert des sorbitimpermeablen Raumes (in μl) liefert die im Stromaraum vorliegende Konzentra-

tion in mM.

$$C_S = \frac{\frac{D_S}{A \cdot \text{Chl.}} - C_M \cdot R_S}{R_{H_2O} - R_S}$$

C_S = Substratkonzentration im sorbitimpermeablen Raum (mM)

C_M = Substratkonzentration im Medium (mM)

D_S = dpm im Sediment

A = spezifische Aktivität (dpm/nMol)

Chl. = Chlorophyllgehalt (mg/Probe)

R_S = Sorbitraum ($\mu\text{l}/\text{mg Chl.}$)

$R_{H_2O} - R_S$ = sorbitimperabler Raum ($\mu\text{l}/\text{mg Chl.}$)

2.3. Ionenaustauschchromatographie zur Bestimmung der Metabolite im Chloroplasten

Mit Hilfe einer im Mikromaßstab durchgeführten Ionenaustauschchromatographie können die Metabolitspiegel während der CO_2 -Fixierung bestimmt werden.

Die Intermediate des Calvin Zyklus werden hierbei durch den Einbau von $[^{32}\text{P}]$ Phosphat, das dem Medium zugegeben wird, radioaktiv markiert. Die belichteten Chloroplasten werden durch Silikonölfiltrationszentrifugation vom Medium getrennt und zum Stop des Stoffwechsels mit HClO_4 (Endkonzentration 0.5 M) sofort deproteinisiert. Überstand und das resuspendierte Sediment werden mit K_2CO_3 neutralisiert, zentrifugiert und

können bei -15°C aufbewahrt werden.

Die sich anschließende Ionenaustauschchromatographie der $[^{32}\text{P}]$ markierten Metabolite wurde zuerst zur Bestimmung des mitochondrialen Metabolitmusters entwickelt (Heldt und Klingenberg 1967) und später für die Bestimmung der Metabolite im Chloroplasten modifiziert (Lilley et al. 1977).

Experimentelle Durchführung:

200 μl eines Extraktes wurden über eine Anionenaustauschsäule (1.1 mm Durchmesser, 1 m lang, Säulenmaterial Bio-Rad AG 1X8, 400 mesh) analysiert. Die Säule wurde zuerst mit 1 ml wassergesättigten Chloroform gewaschen, die Elution erfolgte in einem linearen Gradienten von 0 - 8.4 M Ameisensäure plus 1.5 M Ammoniumformiat mit einer konstanten Durchflußrate von 1.12 ml/h. Die Radioaktivität im Eluat wurde kontinuierlich mit einem Methan Durchflußzähler (Philips) gemessen. Die quantitative Analyse der Peaks erfolgte anhand der bekannten Aktivität des eingesetzten $[^{32}\text{P}]$ Phosphats, die Peakidentifizierung ist von Heldt et al. (1978) beschrieben.

2.4. Isolierung, Markierung und Analyse der Hüllmembranen

2.4.1. Isolierung der Hüllmembranen

Die Isolierung der Hüllmembranen erfolgte nach der von Douce et al. (1973) und Poincelot und Day (1974) modifiziert nach Flügge und Heldt (1976) beschriebenen Methode. Um die Hüllmembranen isolieren zu können, müssen sie zuvor von dem Membransystem der Thylakoide abgetrennt werden. Dies ge-

schieht mit einem osmotischem Schock unter recht milden Bedingungen. Intakte Chloroplasten (0.4 ml, ca. 7.5 mg Chl./ml) wurden mit 4.2 ml Schockmedium (10 mM TRICINE Puffer pH 7.8, 4 mM MgCl_2) für 2 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit Saccharose auf eine Endkonzentration von 10% (w/w) entsprechend 0.32 M eingestellt. Die Abtrennung der Hüllmembranen von dem Thylakoidmembransystem einerseits und den löslichen Enzymen des Stromas andererseits erfolgte zunächst über einen kontinuierlichen Saccharose Gradienten (19 - 31% w/w). Die Lokalisation der einzelnen Bestandteile erfolgte mit Hilfe von Leitenzymen. Als Leitenzym für die löslichen Enzyme des Stromaraumes wurden Carboanhydrase (Aktivitätsbestimmung nach der von McIntosh (1968) beschriebenen pH-Stat Methode) und Ribulose-bisphosphat Carboxylase (Aktivitätsbestimmung nach Lilley und Walker 1974) herangezogen. Zur Lokalisation des Thylakoidmembransystems diente der Chlorophyllgehalt und die Aktivität der Ferredoxin : NADP^+ Oxidoreduktase (Aktivitätsbestimmung nach Forti 1971). Leitenzym für die Hüllmembranen war die von Douce et al. (1973) beschriebene Mg^{++} -abhängige, N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) unempfindliche ATPase, die mit der von ihm beschriebenen Methode getestet wurde. Nach der Bestimmung der Dichten für die Hüllmembranvesikel erfolgte die routinemäßige Isolierung der Hüllmembranen über einen diskontinuierlichen Saccharose Gradienten (Abb. 2). Hierzu wurden die osmotisch geschockte und auf eine Konzentration von 10 % (w/w) eingestellte Chlo-

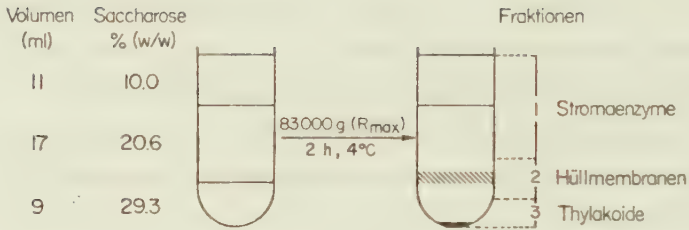


Abb. 2 Diskontinuierliche Saccharose Gradientenzentrifugation zur Isolierung der Hüllmembranen.
Weitere Erläuterungen im Text.

roplastensuspension auf einen diskontinuierlichen Saccharose Gradienten (9 ml 29.3% - 17 ml 20.6% (w/w)) aufgetragen und für 2 h bei 21500 rpm (Zentrifuge Beckman L-5) in einem SW 27 Rotor (Beckman) zentrifugiert. Die Hüllmembranen an der Interphase zwischen der 20.6%/29.3% Saccharose Schicht wurden gesammelt und mit dem oben beschriebenen TRICINE Puffer verdünnt, zentrifugiert (Rotor 40.2 Beckman 35 000 rpm für 30 min) und zweimal gewaschen. Das Sediment stand für die Analyse mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (siehe unter 2.4.3.) zur Verfügung. Die Proteinbestimmungen erfolgten nach Lowry et al. (1951).

2.4.2. Markierung der Hüllmembranpolypeptide mit $[^{35}\text{S}]$ Diazobenzoesulfonsäure (DABS), Pyridoxal 5'-phosphat (PLP)/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$, 2,4,6-Trinitrobenzoesulfonsäure (TNBS)/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ und $[^3\text{H}]\text{N}$ -Äthylmaleinimid (NEM)

Die Markierung der Membranpolypeptide erfolgte im Fall des Einbaus von $[^{35}\text{S}]$ DABS mit den isolierten Hüllmembranen. Die Hüllmembranen (0.15 mg/ml) wurden mit 0.31 mM $[^{35}\text{S}]$ DABS (spezifische Aktivität $2.4\text{--}5.0 \times 10^4$ dpm/nMol) für 45 min bei 4°C inkubiert, zentrifugiert (Rotor 40.2 Beckman, 30 min bei 35 000 rpm) und zweimal gewaschen. Die Inkubationen erfolgten in 50 mM Borat Puffer pH 7.8.

Die Markierung der Membranpolypeptide mit PLP/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ und TNBS/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ wurden dagegen an intakten Chloroplasten vorgenommen. Hierzu wurden die intakten Chloroplasten (0.5 mg/ml, Gesamtvolumen 6 ml) mit den angegebenen Konzentrationen am jeweiligen Inhibitor für 5-25 min bei 4°C inkubiert und die Inkubation durch einen zwei- bis dreifachen molaren Überschuß an $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ (spezifische Aktivität ca. 5×10^4 dpm/ nMol) für 10 min beendet. Die Suspension wurde zentrifugiert und nach zweimaligem Waschen wurden die Hüllmembranen in der unter 2.4.1. beschriebenen Weise isoliert.

Die Markierung mit $[^3\text{H}]\text{NEM}$ erfolgte in analoger Weise sowohl mit intakten Chloroplasten als auch mit isolierten Membranen. Die Konzentrationen an $[^3\text{H}]\text{NEM}$ waren 0.2 bis 2.0 mM (spezifische Aktivität $0.8\text{--}1.0 \times 10^4$ dpm/ nMol), die Inkubationszeit betrug 30 min bei 20°C und weitere 15 min

bei 4 °C.

2.4.3. Analyse der Hüllmembranpolypeptide mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erfolgte nach dem System von Neville (1971). Es wurden 5x 100 mm Gele mit 11.7% Acrylamid und 0.1% N,N'-Methylenbisacrylamid als Quervernetzer verwendet. Der Probenpuffer, in dem die Membranen aufgenommen wurden, bestand aus dem Trenngelpuffer unter Zusatz von 2% SDS, 2% Saccharose, 0.1% DTT und 0.01% Bromphenolblau. Jeweils zwei Parallelproben wurden der SDS-PAGE unterzogen, sollten die Membranpolypeptide auf die eingebaute Radioaktivität hin untersucht werden. Das eine Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blue G-250 angefärbt und nach der Methode von Weber und Osborne (1969) entfärbt. Die densitometrische Messung der SDS-Polyacrylamidgele erfolgte bei 546 bzw. 578 nm. Das andere Gel wurde nach der Elektrophorese in 2 mm Stücke geschnitten, die einzelnen Gelstücke mit NCS (Nuclear Chicago) für 3 h bei 50 °C inkubiert (Basch 1968) und auf Radioaktivität analysiert.

2.4.4. Bestimmung von Molekulargewichten

Das Molekulargewicht in SDS wurde durch eine Coelektrophorese der gereinigten Hüllmembranen mit Eichproteinen bekannten Molekulargewichtes bestimmt. Folgende Eichproteine wurden verwendet: Rinderserumalbumin (66000), Eialbumin (44000), Lactatdehydrogenase (36000), Carboanhydrase (30000), Chymotrypsinogen (25700) und Cytochrom c (12400).

3. ERGEBNISSE

3.1. Isolierung und Charakterisierung der Hüllmembranen, Analyse mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

3.1.1. Isolierung und Charakterisierung

Wie unter 2.4.1. ausgeführt, erfolgte die Lokalisation und die Dichtebestimmung der Membranvesikel zunächst in einem 19-31% (w/w) kontinuierlichen Saccharosegradienten. Abb. 3 zeigt die Verteilung der spezifischen Aktivität der Mg^{++} -abhängigen ATPase als Leitenzym der Hüllmembranen im Gradienten. Man erhält zwei Spitzen für die Aktivitätsverteilung: die erste bei einer Saccharosekonzentration von 21.8% entsprechend einer Dichte von 1.09 g/cm^3 , die zweite bei 25.9% Saccharose, was einer Dichte von 1.11 g/cm^3 entspricht. Eine

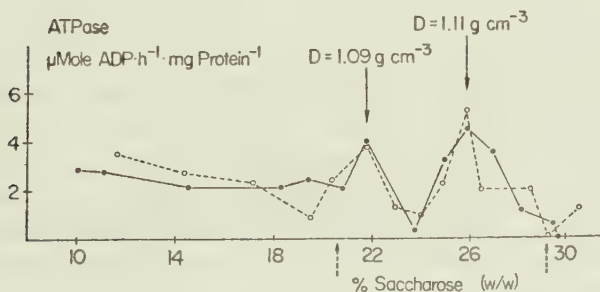


Abb. 3 Aktivitätsverteilung der Mg^{++} -abhängigen ATPase in einem kontinuierlichen Saccharosegradienten. Geschockte Chloroplasten (0.5 mg/ml , Gesamtvolumen 4 ml) wurden auf einem Saccharosegradienten (19-31 % (w/w) Volumen 14 ml) aufgetragen. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten nach 3 h (●—●) bzw. 20 h (○—○) Zentrifugationsdauer in einem SW 27.1 Rotor (Beckman) bei $83\,000 \text{ g (R}_{\text{max}})$ und 4°C .

Zentrifugationsdauer von 3 h im kontinuierlichen Gradienten erwies sich als ausreichend.

Die von Poincelot (1973) als "light" und "heavy fraction" bezeichneten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE untersucht, und es konnte kein Unterschied bezüglich des Polypeptidmusters festgestellt werden. Daher, und um eine größere Trennschärfe zu erreichen, wurde für die weiteren Isolierungen ein diskontinuierlicher Gradient benutzt. Hierzu wurden die Membranen beider Fraktionen durch eine Schicht von 20.6% (w/w) Saccharose hindurch und auf eine 29.3% (w/w) Saccharoseschicht auflaufen gelassen (gestrichelte Pfeile in Abb.3). Die Zentrifugationsdauer wurde für den diskontinuierlichen Gradienten auf 2 h verkürzt.

In den in Abb. 2 definierten Fraktionen (1= Stromaenzyme, 2= Hüllmembranen, 3= Thylakoidmembransystem) wurden der

TABELLE I

VERTEILUNG VON CHLOROPHYLL UND PROTEIN IN DEN VERSCHIEDENEN FRAKTIONEN

Fraktion	Chl. (mg)	Protein (mg)	% Protein vom Gesamtprotein	Protein Chlorophyll
1 Stromaenzyme	0	9.4	51	-
2 Hüllmembranen	~0	0.15	0.8	-
3 Thylakoide	1.02	8.9	48	8.7
Summe	1.02	18.45	-	18.1
Auftrag	1.03	18.50	-	18.0

Chlorophyll- und der Proteingehalt bestimmt (Tab. I) und eine Verteilung erhalten, die mit früher publizierten Ergebnissen übereinstimmt. Die gesamte Chlorophyllmenge fand sich fast ausschließlich in Fraktion 3, die Hüllmembranen (Fraktion 2) erwiesen sich manchmal als mit Spuren Chlorophyll verunreinigt. Das Protein wurde annähernd zu gleichen Teilen in der Stroma- und der Thylakoidfraktion wiedergefunden. Weiterhin ist aus Tab. I ersichtlich, daß der Proteinanteil der Hüllmembranen einen Anteil am Gesamtprotein von 0.6 - 0.9% entspricht. Wie ferner aus den Daten zu ersehen ist, beträgt das Protein/Chlorophyll Verhältnis für die aufgetragene Chloroplastensuspension 18. Der für die Thylakoidfraktion bestimmte kleinere Wert von 8.7 ist in der Freisetzung löslicher Stromaproteine während der Fragmentierung begründet.

Aus Tab. II läßt sich die Verteilung der unter 2.4.1. definierten Leitenzyme in den einzelnen Fraktionen ersehen.

Das Leitenzym für die Thylakoidfraktion, die an der dem Stroma zugewandten Membranoberfläche lokalisierte Ferredoxin:NADP⁺ Oxidoreduktase, findet sich in Übereinstimmung mit den Daten von Douce et al.(1973) ausschließlich in der Thylakoid- und der löslichen Fraktion. In Fraktion 2 konnte dieses Enzym nicht nachgewiesen werden.

Als Leitenzyme für den Stromaraum wurden Carboanhydrase und Ribulosebisdiphosphat Carboxylase herangezogen. Der größte Teil dieser Enzymaktivitäten wurde in Fraktion 1 gefunden. Auch hier zeigte sich, daß Fraktion 2 nicht durch

TABELLE II
SPEZIFISCHE AKTIVITÄTEN DER LEITENZYME IN DEN VERSCHIEDENEN FRAKTIONEN

Fraktion	Protein	Mg ⁺⁺ -abh. ATPase		Carboanhydrase		RuBP Carboxylase		Ferredoxin:NADP ⁺ Oxidoreduktase	
		mg	$\frac{\mu\text{Mol ADP}}{\text{mg Prot.} \cdot \text{min}}$	$\frac{\mu\text{Mol H}^+}{\text{mg Prot.} \cdot \text{min}}$	$\frac{\mu\text{Mol NADH}_2}{\text{mg Prot.} \cdot \text{min}}$	$\frac{\mu\text{Mol K}_3\text{Fe(CN)}_6 \text{ red.}}{\text{mg Prot.} \cdot \text{min}}$			
1 Stromoenzyme	4.5		1.42	340		0.253		0.90	
2 Hüllmembranen	0.1		11.50	0		~0		0	
3 Thylakoide	4.6		0.72	27		0.020		1.54	

Aktivitäten der Stromaenzyme verunreinigt war.

Nachdem Sabins et al. (1970) mit histochemischen Methoden eine Mg^{++} -abhängige ATPase in Hüllmembranen von *Pisum sativum* nachgewiesen hatten, wurde dieses Enzym von Douce et al. (1973) als Leitenzym für die Hüllmembran eingeführt. Die spezifische Aktivität dieses Enzyms war in der Hüllmembranfraktion 2 beträchtlich höher als in der Thylakoidfraktion. Auch in der Stromafraktion 1 konnte eine geringfügige Mg^{++} -abhängige ATPase Aktivität nachgewiesen werden. Diese Aktivität jedoch könnte, wie von Douce et al. (1973) vermutet, durch andere Stromaenzyme, z.B. Phosphatasen, vorgetäuscht werden.

3.1.2. Analyse der Hüllmembranproteine mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Wie unter 2.4.3. ausgeführt, können die isolierten Hüllmembranen mittels einer SDS-PAGE analysiert werden. Hierbei werden die solubilisierten Membranproteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Da Proteine gleichen Molekulargewichts den gleichen R_F -Wert aufweisen, kann mit einer SDS-PAGE aber nicht entschieden werden, ob ein Proteinpeak einheitlich ist oder aus der Überlagerung mehrerer Polypeptide besteht.

Das Polypeptidmuster der Hüllmembranen zeigt im Vergleich zu dem der Mitochondrienmembran (z.B. Klingenberg 1975) einen einfacheren Aufbau (Abb. 4). Dies war nach den unter 1.3. ausgeführten Überlegungen auch zu erwarten. Die Molekulargewichte der Membranproteine wurden durch eine Coelek-

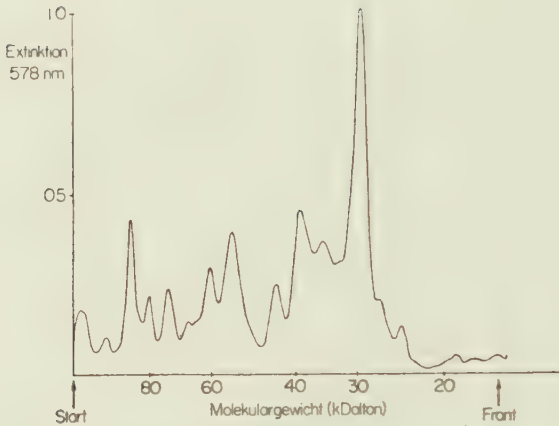


Abb. 4 Densitogramm der Hüllmembranpolypeptide nach einer SDS-Polyacrylamidelektrophorese.

trophorese mit Proteinen bekannten Molekulargewichtes bestimmt. Sie erstrecken sich über einen Bereich von 25 - 100×10^3 Dalton. Dem größten Peak des Proteinspektrums kommt - unter der Voraussetzung, daß dieses Protein einheitlich ist - ein Anteil am Membranprotein von ca. 20% zu. Sein Molekulargewicht kann zu 29 000 Dalton bestimmt werden.

Obwohl der 20%ige Anteil am Gesamtmembranprotein auf Grund des nicht bestimmaren Färbeindex des Proteins nur geschätzt werden kann, ist diese Angabe trotzdem sinnvoll. So ergibt die Abschätzung des Proteinanteils für den mitochondrialen ATP/ADP Translokator, einem integralen Membranprotein, einen Wert von 5-10%, was in guter Übereinstimmung mit dem über die Bindung des spezifischen Inhibitors Carb-

oxyatractylat erhaltenem Wert steht (Riccio et al. 1975, Boxer 1975).

3.2. Der Phosphattranslokator und SH-Reagenzien

3.2.1. Hemmung des Phosphattransports durch SH-Reagenzien

Werdan und Heldt (1974) zeigten, daß der Phosphattransport durch das SH-Reagenz pCMS gehemmt werden kann. Die Abbildungen 5 und 6 zeigen die Abhängigkeit des Transports vom Zusatz weiterer SH-Reagenzien Mersalyl, DTNB und NEM. Die Reaktion des Phosphattranslokators mit den organischen Quecksilberverbindungen und DTNB folgte einer verhältnis-

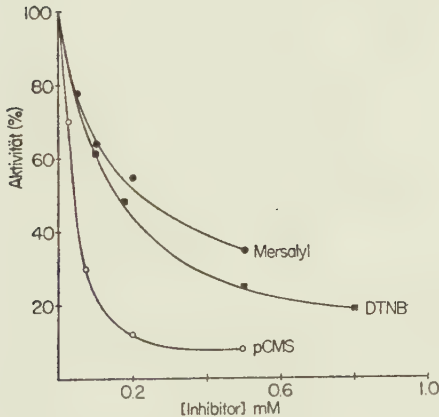


Abb. 5 Hemmung des Phosphattransports durch pCMS, DTNB und Mersalyl. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden mit den gegebenen Konzentrationen an Inhibitor für 7 min vorinkubiert und die jeweiligen Transportraten wie in den Methoden beschrieben bestimmt. Die Kontrollrate war 41 $\mu\text{Mol/mg Chl.}\cdot\text{h}$.

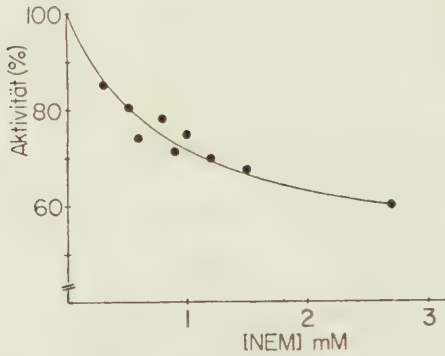


Abb. 6 Hemmung des Phosphattransports durch NEM. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden 30 min bei 20 °C und pH 8.4 mit steigenden Konzentrationen an NEM vorinkubiert und die Phosphattransportrate nach weiteren 15 min bei 4 °C bestimmt. Die Kontrollrate war 23 μ Mol/mg Chl. $\cdot$ h.

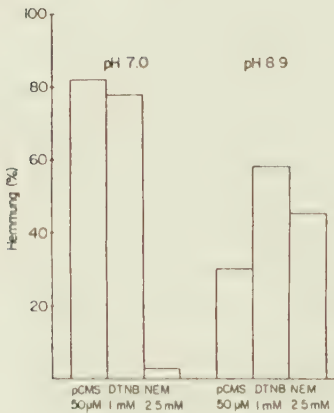


Abb. 7 Hemmung des Phosphattransports durch pCMS, DTNB und NEM bei pH 7.0 und pH 8.9. Inkubationsbedingungen siehe Legenden zu Abb. 5 und 6.

mäßig raschen Kinetik und war bei einer Temperatur von 4°C innerhalb von 2-5 min abgelaufen. Eine Hemmung durch NEM konnte erst nach einer längeren Einwirkungsdauer und zudem bei höherer Temperatur festgestellt werden (30-45 min bei 20°C). Ferner war für eine signifikante NEM Hemmung ein höherer pH-Wert Voraussetzung. Abb. 7 zeigt das Ausmaß der Hemmungen durch pCMS, DTNB und NEM bei pH 7.0 und 8.9. Ein alkalischer pH vergrößert die Reaktivität von NEM, während die Transporthemmung durch pCMS und DTNB sich gegensätzlich verhält und im neutralen pH-Bereich stärker ausgeprägt ist.

Mit dem in Abb. 8 gezeigten Experiment wurde der Typ der Transporthemmung durch pCMS bestimmt. Die Chloroplasten

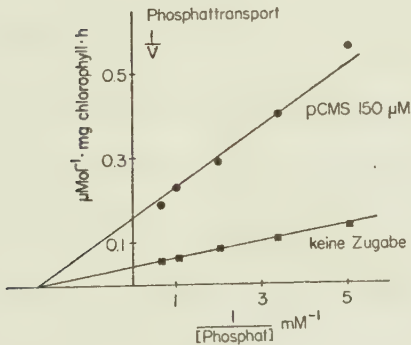


Abb. 8 Hemmung des Phosphattransports durch pCMS in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden mit $150 \mu\text{M}$ pCMS für 7 min vorinkubiert und der Phosphattransport wie in den Methoden beschrieben, gemessen.

TABELLE III

EINFLUSS VON INHIBITOREN AUF DIE BINDUNG VON $[^{203}\text{Hg}] \text{pCMS}$
AN CHLOROPLASTEN

Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 9. Weitere Erläuterungen im Text.

Inhibitor	Konzentration (μM)	Aktivität (%)	$[^{203}\text{Hg}] \text{pCMS}$ gebunden (nMol/0.03 mg Chl.)
pCMS	0	100	0.79
	20	70	0.60
	125	17	0.25
	500	3	0.18
DTNB	0	100	1.36
	200	43	1.05
	500	26	0.95
	1000	9	0.86
Mersalyl	0	100	0.92
	50	78	0.86
	100	69	0.79
	200	55	0.71
	500	33	0.56

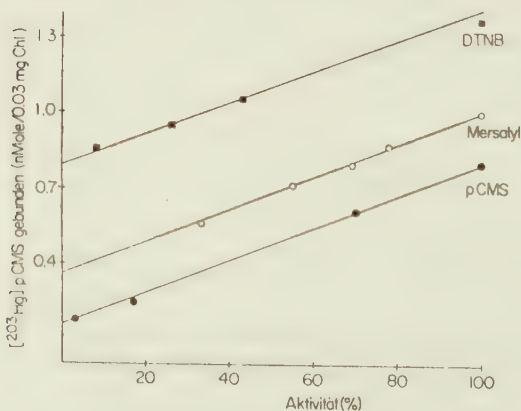


Abb. 9 Korrelation der Phosphatransporthemmung durch DTNB, Mersalyl und pCMS mit der Bindung von $[^{203}\text{Hg}] \text{pCMS}$. Die Chloroplastenkonzentration war 0.1 mg/ml, das Inkubationsvolumen 0.3 ml. Weitere Erläuterungen im Text. Daten

wurden mit einer Konzentration pCMS vorinkubiert, anschließend die Transportgeschwindigkeiten bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen gemessen. Die gewonnenen kinetischen Daten wurden in einem Diagramm nach Lineweaver und Burk (1934) aufgetragen und belegen für pCMS ein nicht-kompetitives Hemmverhalten.

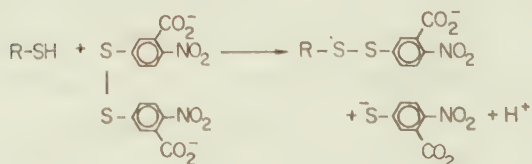
Aus Abb. 5 ist ersichtlich, daß das Ausmaß der durch die SH-Reagenzien pCMS, DTNB und Mersalyl hervorgerufenen Transporthemmungen vergleichbar ist. Im Folgenden sollte daher geprüft werden, ob die durch DTNB und Mersalyl bewirkte Transporthemmung über eine Reaktion mit der gleichen SH-Gruppe verläuft, die auch für pCMS reaktiv ist. Hierzu wurden die Chloroplasten mit steigenden Konzentrationen an pCMS, DTNB und Mersalyl 7 min vorinkubiert. In einem Ansatz wurden anschließend die Transportaktivitäten in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration bestimmt (Tab.III, Spalte 2 und 3). In einem Parallelexperiment wurde der Einfluß der Vorinkubationen mit den Inhibitoren auf die Bindung von radioaktiv markiertem $[^{203}\text{Hg}]$ pCMS gemessen (Tab.III, Spalte 2 und 4). Wie ersichtlich, wird mit steigenden Konzentrationen an Inhibitor der Transport zunehmend gehemmt, während die Bindung von $[^{203}\text{Hg}]$ pCMS an die Chloroplasten reduziert wird. Die Ergebnisse aus den Transport- und den Bindungsstudien (Tab. III, Spalte 3 und 4) wurden gegeneinander aufgetragen (Abb. 9), wobei diese Korrelation für pCMS eine Gerade liefert. Die Meßpunkte aus den mit DTNB und Mersalyl durchgeführten Experimenten liegen ebenfalls

auf einer Geraden, die parallel zu der für pCMS ermittelten verläuft. Die Bindung von $[^{203}\text{Hg}]p\text{CMS}$ an den Phosphattranslokator wird also durch DTNB und Mersalyl in der gleichen Weise wie durch pCMS beeinflusst. Dies läßt den Schluß zu, daß die Hemmung der Transportaktivität durch diese drei Reagenzien über eine Reaktion mit derselben SH-Gruppe erfolgt.

3.2.2. Funktion und Lokalisation der SH-Gruppe

Die bisher dargestellten Experimente zeigten, daß der Phosphattranslokator durch SH-Reagenzien gehemmt werden kann. Über die funktionelle Bedeutung der reaktiven SH-Gruppe und seine Lokalisation können damit jedoch keine Aussagen gemacht werden. Diese Fragen sollten mit den folgenden Experimenten geklärt werden.

Wenn DTNB mit SH-Gruppen in Proteinen reagiert, bildet es ein gemischtes Disulfid unter gleichzeitiger Freisetzung des Thionitrobenzoesäure (TNB) Restes.



Der Angriff eines nucleophilen Reagenzes wie das Cyanidion auf ein solches unsymmetrisch substituiertes Disulfid führt zur Abspaltung des TNB Restes als guter Abgangsgruppe (Parker und Kharash 1960). Die SH-Gruppe wird durch

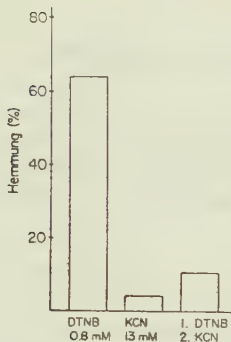


Abb. 10 Reversibilität der DTNB-Hemmung durch KCN.
Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden für 7 min mit 0.8 mM DTNB, anschließend für 30 min mit 13 mM KCN bei 20 °C und pH 7.0 vorinkubiert. Die Messung des Phosphattransports erfolgte nach weiteren 15 min bei 4 °C. Die Kontrollrate war 25 $\mu\text{Mol/mgChl.}\cdot\text{h}$.

diese Reaktion in eine S-CN Gruppe überführt. Falls die SH-Gruppe des Translokators für den Transportschritt essentiell ist, sollte das SCN Derivat des Translokators katalytisch inaktiv sein. Das in Abb. 10 dargestellte Experiment zeigt jedoch, daß die Transportaktivität nach der Derivatisierung fast vollständig zurückerhalten wird. Die SH-Gruppe des Translokators erweist sich somit als nicht funktionell, d.h. als an der Transportkatalyse nicht beteiligt.

Um zu einer Aussage über die Lokalisation der SH-Gruppe bezüglich des aktiven Zentrums zu kommen, wurde der Einfluß von 3-PGA und Phosphat als Substrate des Translokators auf die Transporthemmung durch pCMS und NEM gemessen

TABELLE IV

HEMMUNG DES PHOSPHATTRANSPORTS DURCH pCMS UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Intakte Chloroplasten (0.14 mg/ml) wurden mit den angegebenen Substraten (10 mM für 10 min) vorinkubiert. Nach der Inkubation mit pCMS (0.5 mM für 7 min) wurden die Chloroplasten zentrifugiert (SS 34 Rotor, 1000 x g für 1 min) und gewaschen. Die Chloroplasten wurden resuspendiert, und die Messung des Phosphattransports erfolgte wie in den Methoden beschrieben. Mittelwerte aus 3 Experimenten.

Zugaben	Phosphattransport $\mu\text{Mol} \cdot (\text{mg Chl.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Hemmung (%)
Kontrolle	38	-
pCMS	13	64
Phosphat, dann pCMS	20	47
3-PGA, dann pCMS	21	45
2-PGA, dann pCMS	17	54

TABELLE V

HEMMUNG DES PHOSPHATTRANSPORTS DURCH NEM UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Intakte Chloroplasten (0.12 mg/ml) wurden mit den angegebenen Substraten (10 mM für 10 min) bei pH 8.4 vorinkubiert. Nach der Inkubation mit NEM (6mM für 30 min bei 20 °C und 15 min bei 4 °C) wurde wie in der Legende zu Tabelle IV verfahren. Mittelwerte aus 4 Experimenten.

Zugaben	Phosphattransport $\mu\text{Mol} \cdot (\text{mg Chl.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Hemmung (%)
Kontrolle	27	-
NEM	9	66
Phosphat, dann NEM	17	37
3-PGA, dann NEM	16	38
2-PGA, dann NEM	5	82

(Tabelle IV). Es zeigte sich, daß der Translokator durch seine Substrate - unter den gegebenen Bedingungen - nur geringfügig geschützt wurde. Bei diesem und den folgenden analogen Experimenten wurde der Effekt von 2-PGA als Kontrolle gemessen. 2-PGA besitzt nur eine geringe Affinität zum Translokator, was sich in dem im Vergleich zum Phosphat bzw. 3-PGA 20-fach größeren K_M -Wert dokumentiert. Bezogen auf den "Schutz" durch 2-PGA beträgt der spezifische Schutz des Translokators vor der pCMS Hemmung durch seine Substrate Phosphat und 3-PGA nur ca. 10 %.

Analoge Experimente wurden durchgeführt, um den Einfluß von Substraten auf die Hemmung des Phosphattransports durch NEM zu studieren. Hier zeigen P_i und 3-PGA deutlichere Schutzeffekte, während durch 2-PGA noch eine Stimulierung des Hemmeffektes erreicht wird.

3.2.3. Markierung der Hüllmembran mit $[^3H]$ NEM

Im vorstehenden Abschnitt wurde gezeigt, daß der Phosphattransport durch NEM hemmbar ist. Da NEM kovalent und irreversibel an Proteine bindet, stellte sich die Frage, inwieweit dieses Reagenz zur Markierung der für den Transport verantwortlichen Membrankomponente verwendbar war. Das Translokatorpeptid sollte durch NEM markiert werden können, wenn radioaktives NEM in einer für die Hemmung des Phosphattransports genügend hohen Konzentration eingesetzt würde. Dies wurde experimentell überprüft, indem intakte Chloroplasten mit $[^3H]$ NEM inkubiert, die Hüllmembranen isoliert und die Membranpolypeptide anschließend mittels

SDS-PAGE analysiert wurden. Die durchgezogenen Linien in Abb. 13 und 14 zeigen Einbaumuster von $[^3\text{H}]\text{NEM}$, in Konzentrationen von 1 bzw. 2 mM eingesetzt. Man erhält eine fast uniforme Markierung sämtlicher Membranpolypeptide. Dieses Resultat war zu erwarten, da NEM ein relativ unspezifisches SH-Reagenz darstellt. Es wurde daher nach einem Weg gesucht, die Spezifität der NEM Bindung zu erhöhen. Hierzu wurde von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, das Phosphattransportsystem durch den reversiblen Inhibitor pCMS vor der Hemmung durch NEM zu schützen. Das in Abb. 11 dargestellte Experiment zeigt, daß das mit pCMS gehemmte Transportsystem durch eine nachfolgende Inkubation mit dem Thiol DTT

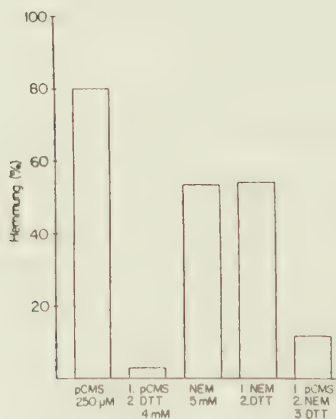


Abb. 11 Einfluß von pCMS auf die Hemmung des Phosphattransports durch NEM. Die Inkubationszeiten für pCMS, DTT und NEM betrugen jeweils 2, 5 bzw. 30 min bei pH 8.4 und 20 °C. Die Messung des Phosphattransports erfolgte nach weiteren 15 min bei 4 °C. Die Kontrollrate war 22 µMol/mg Chl.-h. Weitere Erläuterungen im Text.

wieder reaktiviert werden kann (Kolonne 1 und 2), während NEM irreversibel mit dem Translokator reagiert (Kolonne 3 und 4). Inkubiert man nun die Chloroplasten zuerst mit pCMS, um den Translokator zu hemmen, und anschließend mit NEM, wird die Transportaktivität nach DTT Zugabe fast vollständig zurück erhalten (Kolonne 5). pCMS vermag also den Translokator vor der irreversiblen Hemmung durch NEM zu schützen. Unter der Voraussetzung, daß pCMS ein für das Phosphattransportsystem spezifischerer Inhibitor ist als NEM, läßt sich dieser Effekt auch für eine spezifischere Markierung der Membranproteine einsetzen. Die experimentelle Strategie, in ähnlicher Form von Coty und Pedersen (1975) bzw. Hadvary und Kadenbach (1976) zur Identifizierung des mitochondrialen Phosphattransportsystems ein-

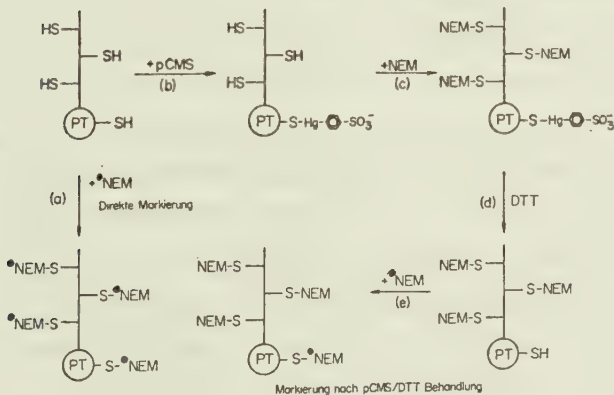


Abb. 12 Direkte Markierung (a) und Effekt der pCMS-NEM-DDT Vorbehandlung (b-e) auf die Markierung des Phosphattransportsystems mit $[^3\text{H}]\text{NEM}$. PT steht für Phosphattranslokator. Erläuterungen im Text.

gesetzt, wird in Abb. 12, Reaktionen b-e, verdeutlicht. Durch pCMS kann die SH-Gruppe des Translokators geschützt (b), weitere SH-Gruppen der Membran, die nicht am Phosphat-transport beteiligt sind, können mit NEM alkyliert werden (c). Zugabe von DTT bewirkt die Abspaltung des pCMS-Restes vom Translokator (d), die Transportaktivität wird reaktiviert (Abb. 11, Kolonne 5). Eine sich anschließende Inkubation mit [^3H]NEM markiert die nun zugängliche SH-Gruppe des Translokators (e), daneben auch die Membranproteine, die ebenfalls mit pCMS vor dem Einbau von NEM geschützt werden. Im Gegensatz zu dieser "Markierung nach pCMS/DTT Behandlung" kann NEM, werden die Chloroplasten unvorbehandelt eingesetzt, mit sämtlichen zugänglichen SH-Gruppen der Membran reagieren ("Direkte Markierung" Abb. 12 a). Das experimentelle Resultat zeigt Abb. 13. Die durchgezogene Linie repräsentiert, wie oben ausgeführt, den direkten und unspezifischen Einbau in Polypeptide der Hüllmembran. Die markierten Proteine sind mit römischen Ziffern I - VIII numeriert. Ein qualitativ anderes Markierungsprofil wurde erhalten, wenn der Einbau von NEM in die Membranpolypeptide nach Vorbehandlung der Chloroplasten mit pCMS/DTT untersucht wurde (Abb. 13, gestrichelte Linie). Die Bindung von [^3H]NEM an die Membranfraktion betrug jetzt nur noch 6.7 nMol/mg Membranprotein gegenüber 16.4 nMol/mg Membranprotein im Fall der direkten Markierung (Mittelwerte aus 4 Experimenten). Zugleich wurde die Spezifität für NEM beträchtlich erhöht. So wiesen die Proteinpeaks I - V und VII nach der pCMS/DTT Vorbehandlung keine bzw. im Vergleich

zur Kontrollmarkierung nur eine stark reduzierte Markierung auf. Im Gegensatz dazu wurde der NEM Einbau in die Membranpolypeptide VI und VIII durch die Vorbehandlung nur gering beeinflusst. Diese beiden Membranproteine werden also durch pCMS vor dem Angriff durch NEM geschützt. Da dieser Effekt auch für den Phosphattranslokator nachgewiesen wurde (Abb.11),

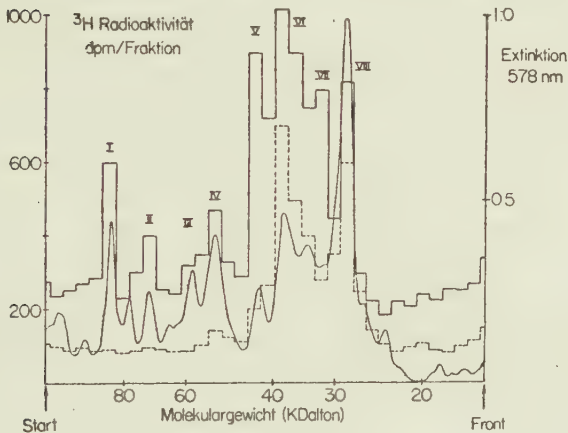


Abb. 13 SDS-PAGE der Hüllmembranpolypeptide und der Effekt der "pCMS/DTT Behandlung" auf die Markierung mit [³H]NEM. Intakte Chloroplasten (0.45 mg/ml, Gesamtvolumen 10 ml, pH 8.4) wurden für 2 min mit 250 µM pCMS, anschließend für 45 min mit 5 mM NEM inkubiert. Nach Zugabe von 4 mM DTT (5 min) wurden die Chloroplasten zentrifugiert (Rotor SS 34 1000 x g für 1 min), zweimal gewaschen und in 4 ml Medium pH 8.4 aufgenommen. Die Markierung erfolgte mit 1 mM [³H]NEM (spez. Aktivität 1×10^4 dpm/nMol) und wurde nach 30 min bei 20 °C und 15 min bei 4 °C mit 2 mM DTT gestoppt. Die weitere Aufarbeitung ist in den Methoden beschrieben. Die durchgezogene Linie repräsentiert das Densitogramm der Membranproteine, die durchgezogene Kästchenlinie die "direkte Markierung", die gestrichelte Kästchenlinie die "Markierung nach pCMS/DTT Behandlung".

sollte eines dieser markierten Polypeptide das Transportsystem repräsentieren.

Eine weitere Möglichkeit, das Transportsystem als Komponente der Hüllmembran zu identifizieren, besteht in einer Korrelation zwischen der Hemmung des Phosphattransports und dem Einbau von NEM in die Polypeptide der Hüllmembran in Abhängigkeit von vorgegebenen NEM Konzentrationen. Hierzu wurden die Chloroplasten mit steigenden Konzentrationen an

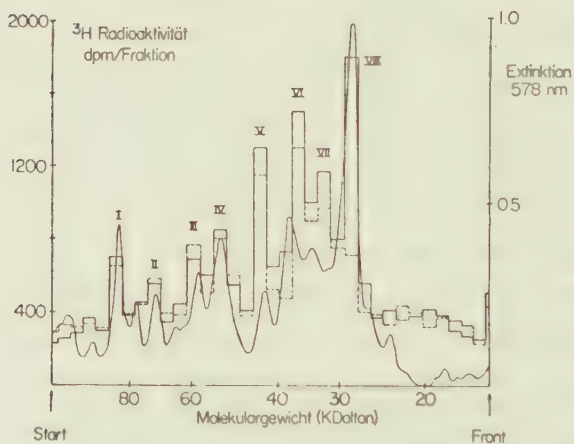


Abb. 14 SDS-PAGE der Hüllmembranpolypeptide und die Markierung mit 0.4 mM und 2 mM [³H]NEM. Intakte Chloroplasten (0.8 mg/ml, Gesamtvolumen 4 ml) wurden für 30 min bei 4 °C mit 0.4 bzw. 2 mM [³H]NEM (spezifische Aktivität 0.8 - 1.0 x 10⁴ dpm/nMol), anschließend für 5 min mit 2 mM DTT inkubiert, die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in den Methoden beschrieben. Die durchgezogene Linie repräsentiert das Densitogramm der Membranpolypeptide, die durchgezogene bzw. gestrichelte Kästchenlinie die Markierungen mit 0.4 bzw. 2 mM [³H]NEM.

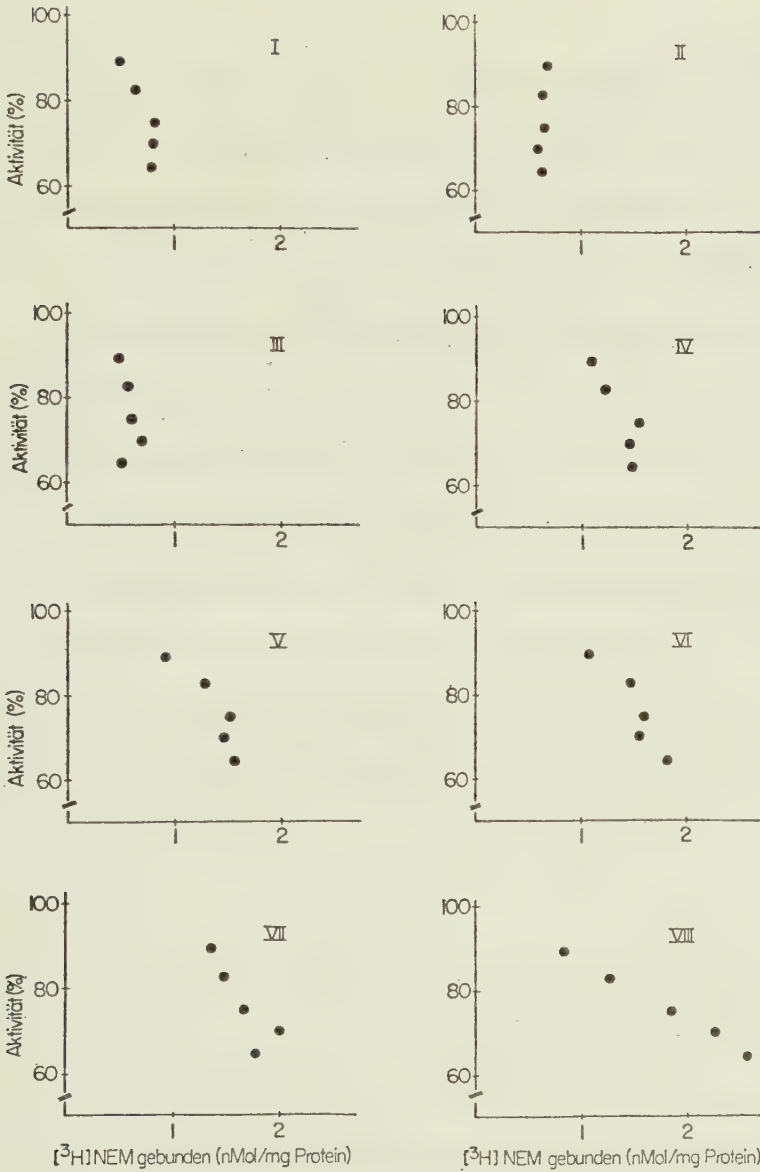


Abb. 15 Korrelation der Phosphat-Transporthehmung und des Einbaus an Radioaktivität in die markierten Membranpolypeptide I - VII bei steigenden Konzentrationen an NEM. Weitere Erläuterungen im Text.

NEM (0.2 - 2 mM) vorinkubiert und in parallelen Ansätzen das Ausmaß der Transporthemmung gemessen bzw. der Einbau von NEM in die Membranpolypeptide verfolgt. Abb. 14 zeigt das Einbaumuster von [^3H]NEM in die Hüllmembranen intakter Chloroplasten, die mit 0.4 mM (gestrichelte Linie) bzw. 2.0 mM NEM (durchgezogene Linie) inkubiert wurden. Während der Einbau von NEM in die Membranpolypeptide I - VII durch die 5-fach höhere NEM Konzentration nur geringfügig erhöht wird, ist der Unterschied für die Membrankomponente VIII auffallend. Obwohl anteilmäßig das größte Polypeptid der Hüllmembran, ist die Markierung, die mit 0.4 mM NEM erreicht wird, nur schwach ausgeprägt und wird erst bei der höheren NEM Konzentration deutlich. Es wurde untersucht, ob sich für die markierten Membrankomponenten I - VIII die Menge an eingebautem NEM mit der Hemmung des Phosphattransports in Abhängigkeit von den vorgegebenen Inhibitorkonzentrationen korrelieren läßt. Diese Daten zeigt Abb. 15 a-h. Es ist daraus ersichtlich, daß sich eine solche Korrela-

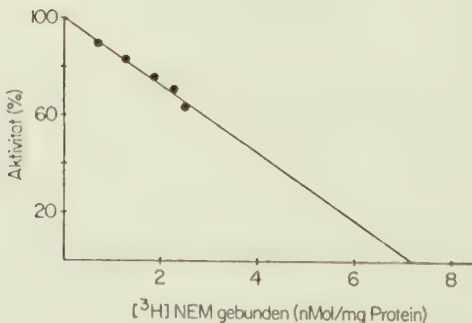


Abb. 16 Extrapolation auf die maximale Bindung von [^3H]NEM an das Membranpolypeptid VIII.

tion, deren Gerade vom 100 % Aktivitätswert ausgeht, einzig für das Membranpolypeptid VIII herstellen läßt. Dieser Komponente, mit einem Anteil von 20 % am Gesamtmembranprotein und einem Molekulargewicht von 29 000 Dalton (siehe unter 3.1.2.), kann somit die Translokator Aktivität zugewiesen werden. Die Extrapolation auf die maximale Bindung (= 100 % Hemmung) ergibt einen Einbau von 7.2 nMol/mg Membranprotein (Abb. 16), was bei einem 20 %igen Anteil am Membranprotein einer Bindung von 36 nMol/mg des 29 000 Dalton Proteins entspricht. Dieser Wert entspricht einer Bindung von 1.04 Mol NEM/Mol 29 000 Dalton Protein.

3.3. Untersuchungen mit p-Diazobenzoessulfonsäure (DABS)

3.3.1. Einfluß von DABS auf den Phosphattransport

Diazoniumsalze werden seit langem zur Modifizierung von Proteinen eingesetzt (Pauly, 1904). Eine der gebräuchlichsten Verbindungen ist Diazobenzoessulfonsäure (DABS), die mit den Aminosäureresten von Tyrosin, Histidin, Lysin, Cystein und Arginin reagiert. (Howard und Wild 1957, Higgins und Harrington 1959).

Mit diesem Reagenz kann der Phosphattransport in Chloroplasten gehemmt werden. Der zeitliche Verlauf der Inaktivierungsreaktion für verschiedene DABS Konzentrationen wurde experimentell untersucht. Trägt man den Logarithmus der Transportaktivitäten gegen die Inaktivierungszeit auf, erhält man für verschiedene DABS-Konzentrationen Geraden (Abb. 17). Dies zeigt, daß die Inaktivierungsreaktion mit

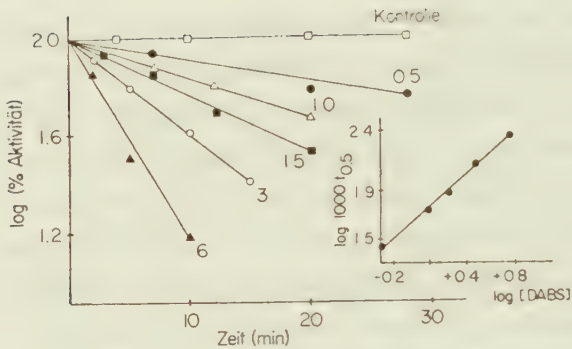


Abb. 17 Zeitabhängigkeit der Phosphat-Transporthemmung durch DABS. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden mit den angegebenen Konzentrationen an DABS inkubiert. Die Messung der Transportraten erfolgte nach verschiedenen Zeiten wie in den Methoden beschrieben. Die Kontrollrate war 35 $\mu\text{Mol/mg Chl.}\cdot\text{h}$.

Abb. 17 rechts: Reaktionsordnung der Inaktivierung in Bezug auf die Konzentration an DABS. Die Daten wurden wie im Text beschrieben aufgetragen. Die Steigung der Geraden entspricht der Reaktionsordnung.

DABS nach einer Kinetik pseudo-erster Ordnung verläuft.

Aus einer solchen Kinetik läßt sich nach Levy et al. (1963) die Ordnung der Inaktivierungsreaktion bezüglich des Inhibitors ermitteln. Hierzu wird der Logarithmus der reziproken Halbwertszeiten ($\log 1/t_{0.5}$) als Maß für die Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierung gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen. In diesem Diagramm erhält man eine Gerade mit einer Steigung von n , wobei n die Anzahl der Inhibitormoleküle ist, die mit dem aktiven Zentrum unter Bildung eines in-

TABELLE VI

HEMMUNG DES PHOSPHATTRANSPORTS DURCH DIAZOBENZUESULFON-
SÄURE (DABS) UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) in einem Sorbit-Borat Medium, pH 7.8, wurden 40 min mit 1 mM DABS und den angegebenen Substraten (3-PGA und 2-PGA jeweils 10 mM, Phosphat 20 mM) inkubiert. Nach der Zugabe von 25 mM Histidin wurden die Chloroplasten zentrifugiert und weiter wie in der Legende zu Tab. IV verfahren. Mittelwerte aus 3 Experimenten.

Zugaben	Phosphattransport $\mu\text{Mol} \cdot (\text{mg Chl.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Hemmung (%)
Kontrolle	45	-
DABS	30	33
Phosphat und DABS	37	18
3-PGA und DABS	38	16
2-PGA und DABS	31	32

aktiven Enzym-Inhibitor Komplexes reagieren.

Die Daten aus Abb. 17 in dieser Weise aufgetragen, ergeben eine Gerade mit einem Anstieg von 0.9 (Abb. 17 rechts).

Dies zeigt, daß die Inaktivierung des Phosphattransports durch die Reaktion eines Moleküls DABS mit dem aktiven Zentrum des Translokatorproteins hervorgerufen wird.

Ferner wurde überprüft, ob die Substrate des Phosphattranslokators die Hemmung des Phosphattransports beeinflussen.

Die Werte aus Tabelle VI zeigen, daß der Phosphattranslokator durch seine Substrate 3-PGA und Phosphat vor der Hemmung mit DABS geschützt wird. 2-PGA mit nur einer sehr geringen

Affinität zum Phosphattransportsystem hat keinen Einfluß auf den Hemmeffekt. Demnach wird die Bindung von DABS, die über die Ausbildung eines 1:1 Komplexes zwischen einem Aminosäurerest im aktiven Zentrum des Translokators und dem Inhibitor verläuft (Abb. 17), durch die Substrate spezifisch reduziert.

Wie ausgeführt, besitzt DABS eine breite Reaktivität gegenüber Aminosäureresten. Es sollte daher die Frage beantwortet werden, ob die durch DABS verursachte Hemmung auf Grund einer Bindung an die für pCMS reaktive und unter 3.2. beschriebene SH-Gruppe hervorgerufen wird. Wie in Abb. 11 gezeigt, kann pCMS durch nachfolgende Zugabe von DTT abgespalten und die durch pCMS hervorgerufene Transporthemmung



Abb. 18 Einfluß von pCMS auf die Hemmung des Phosphat Transports durch DABS. Die Inkubationszeiten betrugen für pCMS und DTT jeweils 5 min, für DABS 45 min. Die Messung der Transportraten erfolgte wie in den Methoden beschreiben. Die Chloroplastenkonzentration war 0.1 mg/ml, die Kontrollrate 35 µMol/mg Chl.·h.

aufgehoben werden. Unter der Annahme, daß beide Reagenzien mit dem gleichen Aminosäurerest reagieren, sollte DABS nach einer Vorinkubation mit pCMS nicht mehr gebunden werden können. Eine nachfolgende Inkubation mit DTT sollte also den Phosphattransport vollständig reaktivieren. Reagieren pCMS und DABS jedoch mit verschiedenen Aminosäureresten, erfolgt also ihre Bindung unabhängig voneinander, würde durch die nachfolgende DTT Inkubation die SH-Gruppe zwar reaktiviert, die durch DABS verursachte Hemmung bliebe aber unbeeinflusst. Abb. 18 zeigt den experimentellen Befund. Die durch DABS nach einer Vorinkubation mit pCMS zu beobachtende Transporthemmung wurde durch Zugabe von DTT nicht aufgehoben. Danach bindet also DABS nicht an die für pCMS reaktive SH-Gruppe, und die Transporthemmungen durch pCMS und DABS werden folglich durch eine Reaktion mit voneinander verschiedenen Aminosäureresten hervorgerufen.

3.3.2. Markierung der Hüllmembran mit $[^{35}\text{S}]$ DABS

Mit Hilfe von $[^{35}\text{S}]$ markiertem DABS kann die Bindung an die Proteine der Hüllmembran verfolgt werden. Abb. 19 zeigt das Einbaumuster einer solchen Markierung. Es ist ersichtlich, daß DABS unspezifisch in alle Proteine der Hüllmembran eingebaut wurde. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit der unspezifischen Reaktivität von DABS gegenüber verschiedenen Aminosäureresten.

Es stellte sich die Frage, wie trotz dieser unspezifischen Bindung an die Membranproteine der Phosphattranslokator identifiziert werden kann. Mit den unter 3.3.1. geschild-

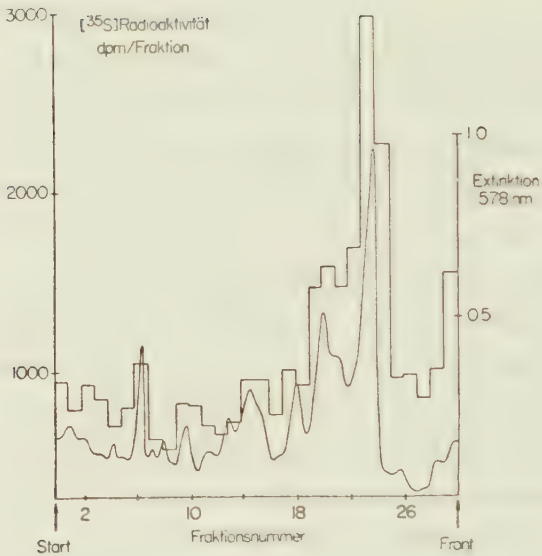


Abb. 19 SDS PAGE der Hüllmembranpolypeptide und Einbau von $[^{35}\text{S}]$ DABS. Die Markierung und weitere Aufarbeitung der Hüllmembranen erfolgte wie in den Methoden beschrieben. Die durchgezogene Linie entspricht dem Densitogramm der Membranpolypeptide, die durchgezogene Kästchenlinie der Markierung mit $[^{35}\text{S}]$ DABS.

derden Experimenten konnte ein spezifischer Substratschutzeffekt gegenüber der Hemmung des Transports durch DABS nachgewiesen werden. Daher wurde geprüft, in welcher Weise die Bindung von $[^{35}\text{S}]$ DABS an die Membranproteine durch die Substrate des Phosphattranslokators beeinflusst wurden. Die Membranen wurden daher vor dem Zusatz von $[^{35}\text{S}]$ DABS und der sich anschließenden Analyse mittels SDS-PAGE mit Phosphat, 3-PGA und 2-PGA inkubiert. Ein Substrateffekt konnte

TABELLE VII

EINBAU VON $[^{35}\text{S}]$ DIAZOBEZOESULFONSÄURE IN DAS 29 000 DALTON MEMBRANPROTEIN UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Experimentelle Bedingungen wie in den Methoden beschrieben. Dem Bezug des Einbaus liegt ein 20%iger Anteil des 29 000 Dalton Proteins am Membranprotein zugrunde. Mittelwerte aus 7 Experimenten.

Zugaben vor der Inkubation mit $[^{35}\text{S}]$ DABS	nMol	% der Kontrolle
	mg 29 000 Dalton Protein	
Kontrolle	8.9	100
Phosphat (20 mM für 10 min)	6.8	77
3-PGA (10 mM für 10 min)	6.0	68
2-PGA (10 mM für 10 min)	9.2	103

tatsächlich nur für ein Membranprotein, das 29 000 Dalton Protein, gezeigt werden; die Bindung von $[^{35}\text{S}]$ DABS an alle anderen Membranpolypeptide blieb durch eine Vorinkubation mit 3-PGA und Phosphat unbeeinflusst. Den spezifischen Substratschutzeffekt bezüglich des $[^{35}\text{S}]$ DABS Einbaus in das 29 000 Dalton Protein zeigt Tabelle VII. Auch hier hat 2-PGA keinen Effekt auf den Einbau der Radioaktivität. Zusätzlich zu dem Schutzeffekt gegenüber der Transporthemmung durch DABS weisen also 3-PGA und Phosphat als Substrate des Translokators auch einen spezifischen Einfluß auf die Bindung von radioaktiv markiertem DABS an das 29 000 Dalton Membranpolypeptid auf. Dieses Protein kann demnach als am Transportprozeß beteiligt angesehen werden.

Mit der für die Substratschutzexperimente eingesetzten Konzentration an $[^{35}\text{S}]$ DABS von 0.36 mM läßt sich eine Hemmung des Phosphattransports von 32 % feststellen. Da unter diesen Bedingungen 8.9 nMol/mg 29 000 Dalton Protein gebunden wurden (Tabelle VII), kann hiermit für die maximale Bindung auf einen Wert von 30.0 nMol/mg dieses Membranproteins extrapoliert werden. Dieser Wert entspricht einer Bindung von 0.87 Mol DABS/Mol 29 000 Dalton Protein.

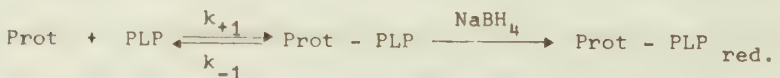
Teile dieser Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Flügge und Heldt, 1976).

3.4. Der Phosphattranslokator und der Einfluß von lysin- und argininspezifischen Inhibitoren

3.4.1. Experimente mit Pyridoxal 5'-phosphat (PLP) und Pyridoxal (PAL)

3.4.1.1. Einfluß auf den Phosphattransport

Während der letzten Jahre wurde PLP vielfach zur selektiven Modifizierung von Lysinresten in Proteinen eingesetzt (Cooper und Reich 1972, Rifkin et al. 1972, Cabantchik et al. 1975, Murphy 1977). Als Aldehyd reagiert es mit einem Lysinrest des Proteins reversibel unter Bildung einer Schiff-schen Base, die irreversibel durch NaBH_4 reduziert werden kann.



(Prot steht für Protein, k_{+1} und k_{-1} für die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- und Rückreaktion.)

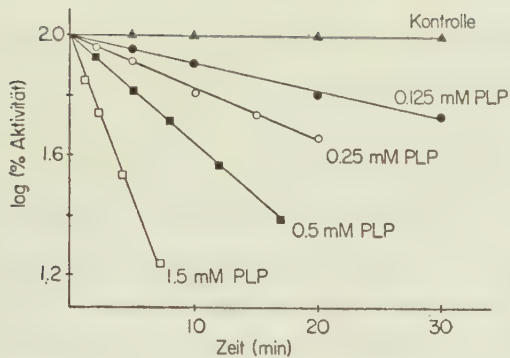


Abb. 20 Zeitabhängigkeit der Hemmung des Phosphattransports durch PLP. Weitere Erklärungen wie in Abb. 17. Die Kontrollrate war $43 \mu\text{Mol/mg Chl.}\cdot\text{h}$.

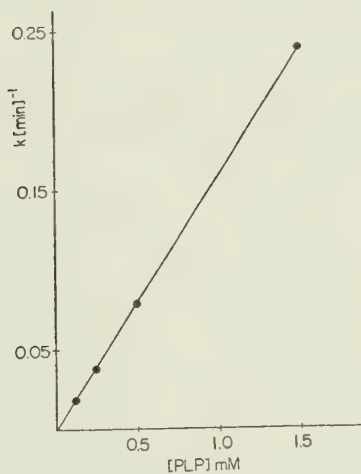


Abb. 21 Abhängigkeit der pseudo-erster Ordnung Geschwindigkeitskonstanten für die Inaktivierung des Phosphattransports von der Konzentration an PLP. Die Geschwindigkeitskonstanten (k) wurden aus den Daten der Abb. 20 erhalten.

Die Inaktivierung des Phosphattransports durch PLP ist abhängig von der PLP Konzentration und der Zeit. Diagramme, in denen der Logarithmus der Aktivität gegen die Inaktivierungszeit durch eine gegebene Konzentration an PLP aufgetragen wurde, sind für den untersuchten Zeitbereich linear (Abb. 20). Dies zeigt, daß die Inaktivierungsreaktion nach einer Kinetik pseudo-erster Ordnung verläuft. Mit längeren Inkubationszeiten wird jedoch auf Grund der Reversibilität der Schiffischen Basen Bildung ein für jede Konzentration an PLP bestimmter Gleichgewichtswert für die Hemmung erreicht.

Die pseudo-erster Ordnung Geschwindigkeitskonstanten der Inaktivierungsreaktion sind direkt proportional zur eingesetzten PLP Konzentration (Abb. 21). Dies belegt eine Gesamtreaktion zweiter Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_{+1} = 183 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ bei pH 7.6 und 4°C .

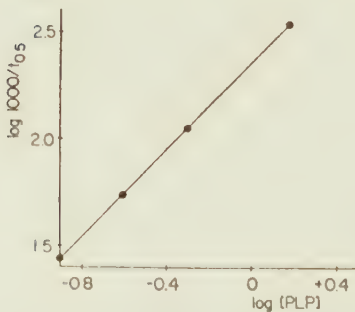


Abb. 22 Bestimmung der Ordnung der Reaktion zwischen Phosphattranslokator und PLP in Bezug auf die Konzentration an PLP. Die Steigerung der Geraden von 1.0 entspricht der Reaktionsordnung.

In Abb. 22 sind die Logarithmen der reziproken Halbwertszeiten der Inaktivierung gegen die Logarithmen der jeweiligen PLP Konzentrationen aufgetragen. Die Meßpunkte liegen auf einer Geraden, die eine Steigung von 1.0 hat. Wie unter 3.3.1. ausgeführt, zeigt dieser Wert, daß die Inaktivierung des Transports durch die Reaktion eines Inhibitormoleküls mit einem Aminosäurerest im aktiven Zentrum des Translokators hervorgerufen wird. Die für PLP geltende Spezifität gegenüber Lysinresten und die Möglichkeit, die Bindung zwischen PLP und dem Translokator mit NaBH_4 irreversibel zu reduzieren (siehe unten), belegen damit die Anwesenheit eines Lysinrestes im aktiven Zentrum des Translokators als Reaktionspartner für PLP.

Die Inaktivierungsreaktion liefert, wie gezeigt, die Geschwindigkeitskonstante für die Hinreaktion ($\text{Prot} + \text{PLP} \xrightarrow{k+1} \text{Prot} - \text{PLP}$, Abb. 20 und 21). Die Geschwindigkeitskonstante für die Rückreaktion, der Dissoziation der Schiff-Base, wurde mit dem in Abb. 23 dargestellten Experiment bestimmt. Die Abbildung zeigt die Inaktivierung des Phosphattransports durch 1 mM PLP. Die Reaktion wurde nach der durch einen Pfeil markierten Zeit mit einem Waschschrift gestoppt. Anschließend wurde die Reaktivierung zeitabhängig verfolgt, die erhaltenen Daten wurden nach einer Kinetik erster Ordnung ausgewertet. Trägt man $\ln (A_0 - A_e) / (A_t - A_e)$ gegen die Zeit auf, wobei A_0 , A_e und A_t die Aktivitäten zur Zeit $t = 0$, im Gleichgewicht ($t = \infty$) und zur Zeit t repräsentieren, liegen die Meßpunkte für die ersten

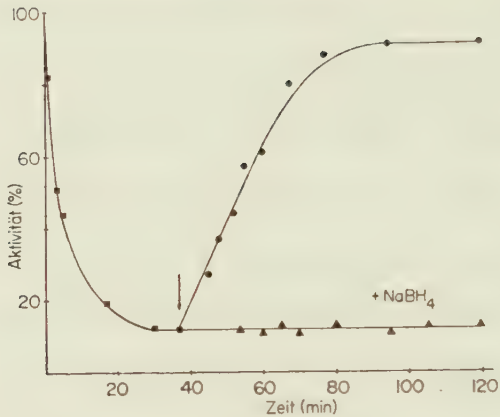


Abb. 23 Reaktivierung des Phosphattransports durch einen Waschschrift nach der Inaktivierung mit PLP. Die Phosphattransportaktivität einer Suspension intakter Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurde durch eine Inkubation mit 1 mM PLP inaktiviert (■). Zu dem durch einen Pfeil markierten Zeitpunkt wurden die Chloroplasten zentrifugiert (SS 34 Rotor 1000 x g für 1 min), gewaschen und resuspendiert. Die Reaktivierung des Transports wurde anschließend zeitabhängig verfolgt (●). In einem Parallel-experiment wurden die Chloroplasten vor dem Waschschrift mit 1.5 mM NaBH_4 inkubiert, anschließend wurde die Transportaktivität gemessen (▲).

Minuten auf einer Geraden (Abb. 24). Aus der Steigung dieser Geraden kann die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation der Schiffschens Base zu $k_{-1} = 0.027 \text{ min}^{-1}$ bestimmt werden. Mit dem Wert von k_{+1} aus dem in Abb. 21 dargestellten Experiment liefert der Quotient k_{-1}/k_{+1} die Dissoziationskonstante des PLP-Translokator-komplexes. Er

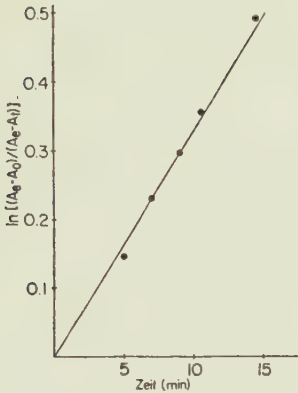


Abb. 24 Pseudo-erster Ordnung Kinetik der Reaktivierung des Phosphattransports nach der Inkubation mit PLP. Die Steigung der Geraden ergibt den Wert für k_{-1} .

beträgt $1.5 \cdot 10^{-4}$ M (Mittelwert aus 5 Experimenten). Das Gleichgewicht der Reaktion liegt also weit auf der Seite des PLP-Translokator Komplexes. Aus Abb. 23 ist ferner ersichtlich, daß PLP durch eine Reduktion mit NaBH_4 irreversibel an den Translokator gebunden wird. Zugabe von NaBH_4 unmittelbar vor der Beendigung der Inaktivierungsreaktion (Pfeil) fixiert das Transportsystem in seinem gehemmten Zustand. Dieses Verhalten charakterisiert die Bindung als eine Schiff'sche Base zwischen PLP und einem Lysinrest des Translokators, die durch NaBH_4 irreversibel reduziert werden kann. Um zu prüfen, inwieweit der für PLP reaktive Lysinrest am Prozeß der Substratbindung beteiligt ist, wurde der Ein-

TABELLE VIII

HEMMUNG DES PHOSPHATTRANSPORTS DURCH PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT (PLP) UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Intakte Chloroplasten (0.13 mg/ml) wurden mit den angegebenen Substraten (10 mM für 10 min) vorinkubiert. Nach der Inkubation mit PLP (0.4 mM für 10 min) wurde NaBH_4 (1 mM für 10 min) zugegeben. Anschließend wurde wie in der Legende zu Tab. IV verfahren. Mittelwerte aus 3 Experimenten.

Zugaben	Phosphattransport $\mu\text{Mol} \cdot (\text{mg Chl.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Hemmung (%)
Kontrolle	39	-
PLP	23	41
Phosphat, dann PLP	37	4
3-PGA, dann PLP	37	3
2-PGA, dann PLP	29	25

fluß von Substraten des Translokators auf die Inaktivierung durch PLP bestimmt. Die Werte der Tabelle VIII zeigen, daß 3-PGA und Phosphat die Hemmung durch PLP in spezifischer Weise herabsetzen. Im Gegensatz dazu wird der Translokator durch 2-PGA weit weniger geschützt.

PAL erweist sich im Vergleich zum PLP als ein weniger potenter Inhibitor. Abb. 25 zeigt die Inaktivierung des Transports durch 7.5 mM PAL und die nach einem Waschschrift (Pfeil) zu registrierende Reaktivierung (Mittelwerte aus 4 Experimenten). Die kinetische Analyse der Inaktivierungsreaktion ergibt eine Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung von $3.2 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die Reaktivierung wurde analog dem

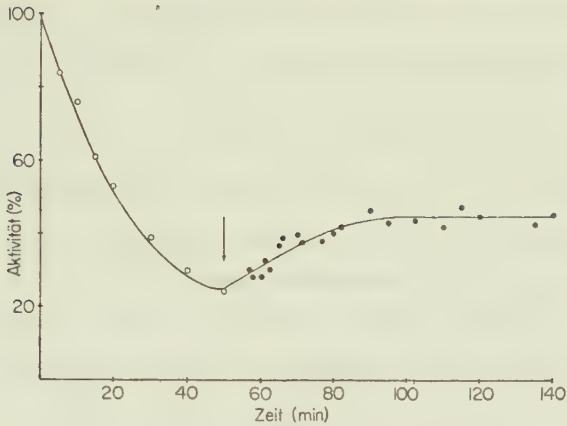


Abb. 25 Reaktivierung des Phosphattransports durch einen Waschschrir nach einer Inaktivierung mit PAL. Die Abbildung zeigt die Inaktivierung des Phosphattransports durch 10 mM PAL (○) und seine Reaktivierung nach einem Waschschrir (●). Experimentelle Durchführung wie in Abb. 23 beschrieben.

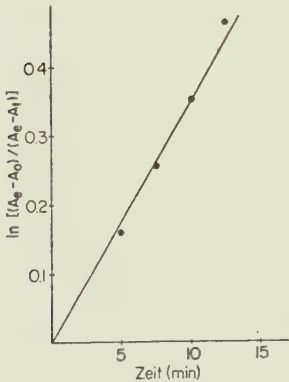


Abb. 26 Pseudo-erster Ordnung Kinetik der Reaktivierung des Phosphattransports nach der Inkubation mit PAL. Die Steigung der Geraden ergibt den Wert für k_{-1} .

in Abb. 24 dargestellten Experiment ausgewertet und lieferte für die Dissoziation des PAL-Translokator Komplexes eine Geschwindigkeitskonstante von 0.030 min^{-1} (Abb. 26). Die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation der Schiff-schen Base ist damit dem für PLP erhaltenen Wert ($k_{-1}(\text{PLP}) = 0.027 \text{ min}^{-1}$) vergleichbar. Der Quotient der Geschwindigkeitskonstanten k_{-1}/k_{+1} liefert wiederum die Dissoziationskonstanten für den PAL-Translokator Komplex und beträgt $9.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, liegt damit also um eine Größenordnung über der Dissoziationskonstanten des PLP-Translokator Komplexes von $1.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

Auffallend ist, daß bei den Reaktivierungsexperimenten mit

TABELLE IX

HEMMUNG DES PHOSPHATTRANSPORTS DURCH PYRIDOXAL (PAL) UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Intakte Chloroplasten (0.14 mg/ml) wurden mit den angegebenen Substraten (10 mM für 10 min) vorinkubiert. Nach der Inkubation mit PAL (7.5 mM für 30 min) wurde wie in der Legende zu Tab. IV verfahren. Mittelwerte aus 3 Experimenten.

Zugaben	Phosphattransport $\mu\text{Mol} \cdot (\text{mg Chl.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Hemmung (%)
Kontrolle	42	-
PAL	17	39
Phosphat, dann PAL	39	6
3-PGA, dann PAL	38	8
2-PGA, dann PAL	30	27

PAL die Ausgangsaktivität nur zu 45 % zurückerhalten wurde (Abb. 25). Mit PLP konnte dagegen eine 90 %ige Reaktivierung erhalten werden (Abb. 23).

Weiterführend wurde der Einfluß der Substrate 3-PGA und Phosphat auf die Hemmung des Transports durch PAL geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle IX zusammengefaßt und ergeben ein dem entsprechenden Experiment mit PLP (Tabelle VIII) analoges Bild. Durch 3-PGA und Phosphat wird das Transportsystem weit stärker als durch 2-PGA vor einem Angriff mit PAL geschützt. Die Ergebnisse aus Tabelle VIII und IX zusammengefaßt erlauben den Schluß, daß für PLP und PAL zugängliche, im aktiven Zentrum lokalisierte Lysinreste an der Substratbindung beteiligt sind.

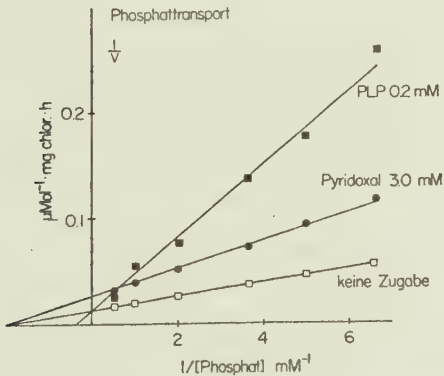


Abb. 27 Hemmung des Phosphattransports durch PLP und PAL in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden mit 0.2 mM PLP bzw. 3 mM PAL für 60 min inkubiert. Anschließend wurde der Phosphattransport wie in den Methoden beschrieben, gemessen.

Ferner wurde der Hemmtyp der Inaktivierung des Transports durch PLP bzw. PAL bestimmt. Kinetische Messungen des Phosphattransports mit steigenden Mengen an Phosphat bei einer jeweils konstanten Inhibitorkonzentration zeigen für PLP die Charakteristika einer kompetitiven Inhibition (Abb. 27). Da die Hemmung des Transports durch PLP zeitabhängig ist (Abb. 20), erfolgte die Analyse des Hemmtyps erst zu dem Zeitpunkt, als sich der für die PLP Konzentration bestimmte Endwert der Hemmung eingestellt hatte. PAL hingegen erwies sich bei der Analyse solcher kinetischer Daten als ein nicht-kompetitiver Inhibitor des Phosphattransports (Abb. 27). Die aus diesen Experimenten ermittelten Inhibitorkonstanten sind $40 \mu\text{M}$ für PLP und 2.4 mM für PAL.

Diese Unterschiedlichkeit bezüglich ihres Hemmverhaltens zusammengekommen mit der im Vergleich zum PLP nur schwach ausgeprägten Reaktivität des PAL verweisen auf die Möglichkeit, daß beide Reagenzien über verschiedene Spezifitäten gegenüber Lysinresten des Translokators verfügen. Es war daher zu prüfen, ob ihre Hemmung unabhängig voneinander erfolgt oder ob z.B. die Reaktivität von PLP durch PAL beeinflußt wird. Hierzu wurde eine Kinetik der Inaktivierung durch PLP und in einem Parallelexperiment eine Kinetik der Inaktivierung durch PAL, nachdem die Chloroplasten mit PAL vorinkubiert wurden, aufgenommen (Abb. 28). Analog wurde weiterhin die Hemmung des Transports durch steigende Konzentrationen an PLP untersucht. Auch hier wurde parallel die Konzentrationsabhängigkeit in einem Ansatz untersucht, dem zuvor PAL zugegeben wurde

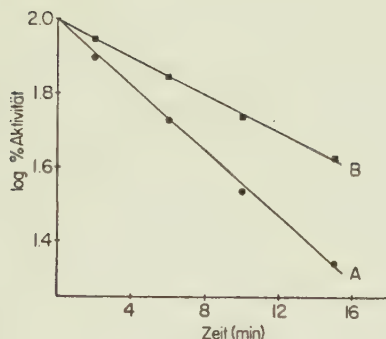


Abb. 28 Einfluß der Vorinkubation von PAL auf die Zeitabhängigkeit der Phosphattransporthemmung durch PLP. In einem Ansatz (Chloroplastenkonzentration 0.1 mg/ml) wurde die Transporthemmung durch 0.6 mM PLP (A), in einem parallelexperiment die Hemmung nach einer Vorinkubation mit PAL (4 mM für 60 min) zeitabhängig verfolgt (B). Die Kontrollraten betrugen 40 bzw. 22 $\mu\text{Mol/mg Chl.}\cdot\text{h}$.

Abb. 29). Aus dem in Abb. 28 dargestellten Experiment lassen sich die Geschwindigkeitskonstanten der Hinreaktion zu $10 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ bzw. $96 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ bestimmen.

Mit Hilfe einer aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleiteten Gleichung lassen sich aus der in Abb. 29 dargestellten Konzentrationsabhängigkeit durch die Messung des Anteils an modifiziertem Protein (= Restaktivität a) die Dissoziationskonstanten in beiden Ansätzen bestimmen.

$$K_D = \frac{a \cdot [\text{PLP}]}{100 - a}$$

Für die Kontrolle errechnet sich eine K_D von $1.1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$.

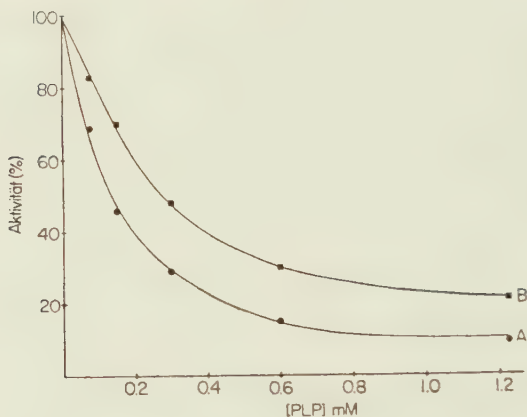


Abb. 29 Einfluß der Vorinkubation von PAL auf die Transporthemmung durch steigende Konzentrationen an PLP. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden mit steigenden Konzentrationen an PLP für 50 min inkubiert, anschließend wurden die Transportraten bestimmt (A). Experiment (B) wie (A), hier wurden die Chloroplasten vor der Zugabe von PLP mit 4 mM PAL für 60 min vorinkubiert. Die Kontrollraten waren 30 bzw. 17 $\mu\text{Mol/mg Chl.}\cdot\text{h}$.

Mit den Geschwindigkeitskonstanten der jeweiligen Hinreaktion können damit die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation der Schiffischen Base, $k_{-1} = K_D \cdot k_{+1}$, zu 0.018 min^{-1} bzw. 0.025 min^{-1} berechnet werden.

Die Dissoziation der jeweiligen Schiffischen Basen bleibt also unbeeinflusst, während die Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung der Schiffischen Base zwischen PLP und dem Translokator durch PAL erniedrigt werden. Zwischen beiden Reagenzien besteht also bezüglich des Inaktivierungsschrittes eine Wechselwirkung. Die Frage, ob die Inaktivierung

mit PLP und PAL durch eine Modifizierung des gleichen Lysinrestes, der nach den Ergebnissen aus Tabelle VIII und IX als im aktiven Zentrum lokalisiert angesehen werden kann, geschieht, wird unter 3.4.4. weiter untersucht.

3.4.1.2. Die Markierung der Hüllmembran mit Pyridoxal 5'-phosphat und Pyridoxal

Wie unter 3.4.1.1. ausgeführt, läßt sich die zwischen PLP bzw. PAL und einem Protein gebildete Schiffsche Base durch NaBH_4 irreversibel reduzieren. Eine Reduktion mit radioaktivem $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ erlaubt zusätzlich, eine Markierung in

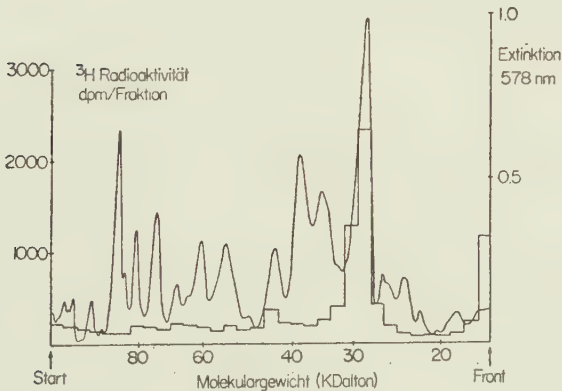


Abb. 30 SDS PAGE der Hüllmembranpolypeptide und die Markierung mit PLP/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$. Die Inkubation der intakten Chloroplasten erfolgte mit 0.5 mM PLP für 20 min, die Markierung mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ (2 mM für 10 min) und die weitere Aufarbeitung wie in den Methoden beschrieben. Die durchgezogene Linie repräsentiert das Densitogramm der Membranpolypeptide, die durchgezogene Kästchenlinie die Markierung mit PLP/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$.

dieses Protein einzuführen. Das radioaktiv markierte Protein kann anschließend mittels einer SDS-Polyacrylamid Elektrophorese lokalisiert werden.

In dem in Abb. 30 dargestellten Experiment wurde die Bindung von PLP an die Proteine der Hüllmembran untersucht. Die Analyse zeigt, daß die Markierung fast ausschließlich in einem einzigen Membranprotein, dem unter 3.2.3. und 3.3.2. charakterisierten 29 000 Dalton Polypeptid erscheint. Eine Markierung mit $\text{PAL}/[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ führte zu einem qualitativ gleichen Ergebnis. Entsprechend der für

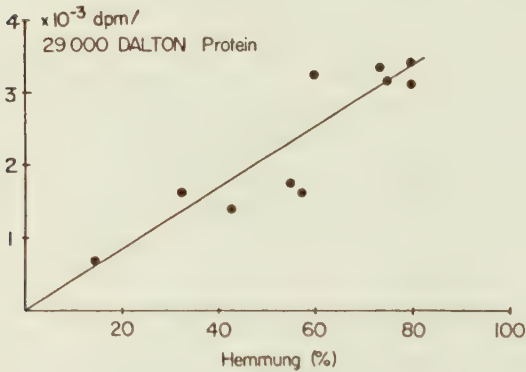


Abb. 31 Korrelation zwischen der Hemmung des Phosphattransports und dem Einbau von PLP in das 29 000 Dalton Polypeptid. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden für verschiedene Zeiten mit 0.5 mM PLP inkubiert. In parallelen Experimenten wurden die Transporthemmungen und der Einbau von PLP in das 29 000 Dalton Polypeptid gemessen. Hierzu wurden die Inkubationen entweder durch eine Silikonölfiltrationszentrifugation bzw. durch die Inkubation mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ beendet. Die Messung des Phosphattransports und die Isolierung und Analyse der Hüllmembranen erfolgte wie in den Methoden beschrieben.

PAL verminderten Reaktivität müssen hier jedoch für eine markante Markierung höhere Konzentrationen an PAL eingesetzt werden.

Die weiteren Versuche sollten die Frage klären, ob dem markierten 29 000 Dalton Protein die Phosphattranslokator Aktivität zugewiesen werden kann. Hierzu wurde der zeitabhängige Einbau von PLP in das 29 000 Dalton Protein mit der Kinetik der Transporthemmung durch PLP korreliert. Die Chloroplasten wurden für verschieden lange Zeiten mit 0.5 mM PLP inkubiert und in parallelen Experimenten die Hemmung des Phosphattransports und der Einbau von PLP in das 29 000 Dalton Protein gemessen. Die Korrelation beider Meßreihen zeigt Abb. 31. Die Meßpunkte zeigen eine lineare

TABELLE X

EINBAU VON PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT IN DAS 29 000 DALTON MEMBRANPROTEIN UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Intakte Chloroplasten (0.5 mg/ml) wurden vor der Zugabe von PLP (0.75 mM für 20 min) mit den angegebenen Substraten (10 mM für 10 min) inkubiert. Die Markierung mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ (2 mM für 10 min) und die weitere Aufarbeitung wie in den Methoden beschrieben. Mittelwerte aus 5 Experimenten.

Zugaben vor der Inkubation mit PLP/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$	dpm	% der Kontrolle
Keine	3950	100
Phosphat	2500	64
3-PGA	2350	59
2-PGA	3300	83

TABELLE XI

EINBAU VON PYRIDOXAL (PAL) IN DAS 29 000 DALTON MEMBRAN-
PROTEIN UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Intakte Chloroplasten (0.5 mg/ml) wurden vor der Zugabe von PAL (7.5 mM für 30 min) mit den angegebenen Substraten (10 mM für 10 min) inkubiert. Die Beendigung der Inkubation erfolgte durch Zentrifugation (SS 34 Rotor 1000 x g für 1 min) und zweimaliges Waschen. Die Chloroplasten wurden resuspendiert, die anschließende Markierung mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ (0.5 mM für 10 min) und weitere Aufarbeitung erfolgte wie in den Methoden beschrieben.

Mittelwerte aus 4 Experimenten.

Zugaben vor der Inkubation mit PAL/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$	dpm	% der Kontrolle
Keine	2850	100
Phosphat	1950	69
3-PGA	1550	55
2-PGA	2350	83

Korrelation. Dies belegt, daß der Einbau von PLP zu der beobachteten Hemmung des Phosphattransports führt.

Ferner wurde geprüft, ob der spezifische Schutzeffekt der Translokatorsubstrate gegenüber der Hemmung des Transports (Tabellen VIII und IX) sich auch für den Einbau der Inhibitoren in das markierte 29 000 Dalton Protein nachweisen ließ. Die Schutzeffekte bezüglich der Markierung zeigen für beide Reagenzien ein ähnliches Bild (Tabellen X und XI). Durch 3-PGA und Phosphat konnte der Einbau von PLP und PAL spezifisch herabgesetzt werden, während der

Schutzeffekt durch 2-PGA schwächer ausgeprägt war.

Die durch PLP bzw. PAL bewirkten Effekte bezüglich der Transportmessungen finden also ihre Entsprechung in den Markierungsexperimenten. Zudem kann die Hemmung des Phosphattransports durch PLP auf einen Einbau dieses Inhibitors in das 29 000 Dalton Protein zurückgeführt werden. Ferner werden Transport und Einbau von PLP bzw. PAL in gleicher Weise durch die Substrate des Translokators be-

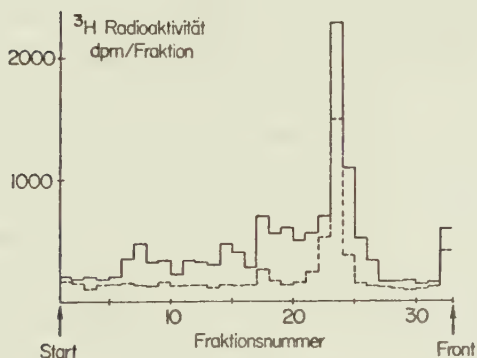


Abb. 32 Einbau von PLP/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ in die Hüllmembranen intakter (---) und geschockter (—) Chloroplasten. Die Markierung der intakten Chloroplasten erfolgte wie in Abb. 30 und den Methoden beschrieben. Andernfalls wurden 0.5 ml einer intakten Chloroplastensuspension (6mg/ml) mit 4.2 ml Schock Medium + 0.5 mM PLP für 2 min bei 4 °C inkubiert und diese Suspension anschließend mit Saccharose auf eine Endkonzentration von 0.32 M eingestellt. Nach weiteren 20 min erfolgte eine Zugabe von $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ (1.5 mM für 10 min) und die anschließende Isolierung und Analyse der Hüllmembranen über einen diskontinuierlichen Saccharose Gradienten mittels einer SDS-PAGE wie in den Methoden beschrieben.

einflußt. Damit kann geschlossen werden, daß das markierte 29 000 Dalton Protein am Prozeß des Transports beteiligt ist.

Wie gezeigt, bindet PLP vorzugsweise nur an ein Protein der Hüllmembran (Abb. 30). Dieses Protein muß für PLP von der Außenseite der Membran zugänglich sein, da PLP auf Grund seines hydrophilen Charakters für biologische Membranen impermeabel ist. Es war daher interessant zu prüfen, welche Veränderung des Einbaumusters festzustellen ist, wenn auch die Innenseite der Hüllmembran, vom Stromaraum her, für PLP zugänglich gemacht wird. Um dieses zu erreichen, wurde dem hypotonen, für den osmotischen Schock eingesetzten Medium PLP zugegeben. Die Markierung erfolgte wie üblich mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ und die Isolierung der Hüllmembranen über den diskontinuierlichen Saccharose Gradienten. Abb 32 zeigt die Markierung intakter Chloroplasten (gestrichelte Linie) - hier ist nur die Außen-, die dem Cytosol zugewandte Seite der Membran für PLP zugänglich - und das Markierungsmuster für den Fall, daß PLP zusätzlich auch von der Stromaseite mit den Membranproteinen reagieren kann (durchgezogene Linie). Hier tragen weitere Membranproteine eine Markierung entsprechend einer erweiterten Reaktivität der Membran für PLP.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht (Flügge und Heldt 1977a,b).

3.4.1.3. Der Einfluß von Pyridoxal 5'-phosphat auf die CO_2 -Fixierung

Wie in der Einleitung ausgeführt, kommt dem Translokator, der den Austransport von Triosephosphaten und 3-PGA als Hauptprodukten der CO_2 -Fixierung im Gegentausch mit Phosphat katalysiert, eine entscheidende Bedeutung bei der Gesamtreaktion der CO_2 -Fixierung zu. Mit den unter 3.4.1.1. geschilderten Experimenten wurde PLP als potenter Inhibitor des Phosphattranslokators beschrieben. Im Folgenden wurde daher geprüft, inwieweit sich eine Hemmung des Phosphattransports durch PLP auf die CO_2 -Fixierung auswirkt.

Beim Einschalten des Lichts läuft die CO_2 -Fixierung durch eine Verzögerungsphase, in der im Stroma die Intermediate des Calvin Zyklus aufgebaut werden. Nach dieser Phase erreicht die CO_2 -abhängige O_2 Entwicklung ihre maximale Geschwindigkeit, und neben Triosephosphaten wird 3-PGA im Austausch gegen Phosphat in das Cytosol transportiert.

Abb.33 zeigt, wie sich in einem Kontrollexperiment die Muster der phosphorylierten Produkte des Calvin Zyklus für den Stroma- (Abb. 33A) und den die Chloroplasten umgebenden Raum (Abb. 33B) während der CO_2 -Fixierung verändern. Wie aus Abb. 33A ersichtlich, findet man im Dunkeln in den Chloroplasten zunächst nur $[\text{}^{32}\text{P}]$ markiertes anorganisches Phosphat (Lilley et al. 1977). Nach Einschalten des Lichts bauen sich dann die für die CO_2 -Fixierung erforderlichen Intermediatspiegel im Stroma auf, und entsprechend sinkt der Spiegel an anorganischem Phosphat. Sind die für die CO_2 -

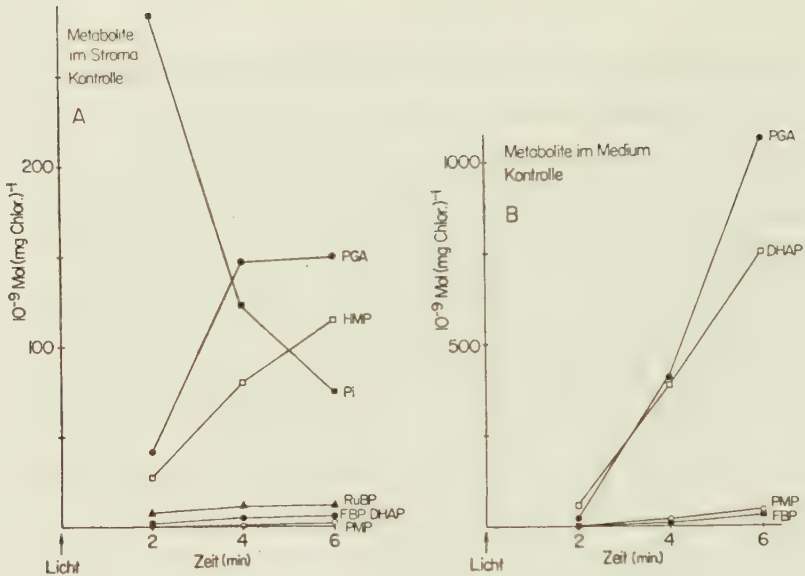


Abb. 33 Verteilung der $[^{32}\text{P}]$ Phosphat markierten Metabolite während der CO_2 -Fixierung. Die Phosphatkonzentration im Medium war 0.5 mM, die O_2 Entwicklung 135 $\mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.}\cdot\text{h}$. A Metabolite im Stroma, B Metabolite im Medium. Vor der Belichtung wurden die Chloroplasten (0.1 mg/ml) 5 min in einem Medium inkubiert, dem zur Markierung der phosphathaltigen Metabolite $[^{32}\text{P}]$ Phosphat zugegeben wurde. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte wie in den Methoden beschrieben.

Fixierung optimalen Metabolitkonzentrationen erreicht, kommt es zu einer maximalen Geschwindigkeit des Austransports der Produkte der CO_2 -Fixierung DHAP und 3-PGA, die dann im Medium erscheinen (Abb. 33B). Damit wird eine maximale Überalles Rate der CO_2 -Fixierung erreicht. Abb 34 zeigt das gleiche Experiment in Gegenwart von PLP. Während

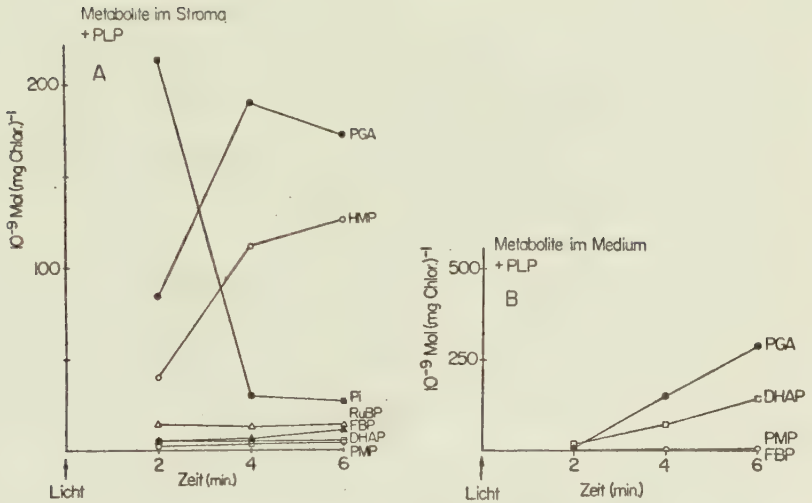


Abb. 34 Einfluß von PLP auf die Verteilung der $[^{32}\text{P}]$ Phosphat markierten Metabolite während der CO_2 Fixierung. Vor der Belichtung wurden die Chloroplasten zusätzlich für 2 min mit 1.7 mM PLP inkubiert. Die O_2 Entwicklung betrug $28 \mu\text{Mol O}_2/\text{mg Chl.}\cdot\text{h}$. A Metabolite im Stroma, B Metabolite im Medium. Sonstige experimentelle Bedingungen wie in Abb. 33.

der Aufbau der Metabolite des Calvin Zyklus im Stoma stimuliert wird (Abb 34A), ist das Erscheinen der Produkte der CO_2 -Fixierung, DHAP und 3-PGA, die über den Phosphat-translokator in das Cytosol transportiert werden, im Medium stark herabgesetzt (Abb. 34B). Entsprechend ist in diesem Experiment die Überalles Rate der CO_2 -Fixierung stark erniedrigt. Dies zeigt deutlich, daß PLP nicht die CO_2 -Fixierung als solche, sondern gezielt den Austransport von DHAP und 3-PGA über den Translokator aus dem Stroma in das

Cytosol hemmt. Da PLP zudem bereits in mikromolarer Konzentration ein Schlüsselenzym der CO_2 -Fixierung, die Ribulosebisdiphosphat Carboxylase, hemmt (Whitman und Tabita 1976, Paech et al. 1977), belegen diese Experimente deutlich die Impermeabilität der Hüllmembran für PLP. Damit ist PLP ein geeigneter Inhibitor, um in intakten Chloroplasten gezielt in den Prozeß der Phosphattranslokation und damit in den der CO_2 -Fixierung einzugreifen. Dies soll mit den folgenden Experimenten gezeigt werden.

Wie in der Einleitung unter 1.2. bereits ausgeführt, wird über die Katalyse eines Gegentauses zwischen Phosphat einerseits und Triosephosphaten andererseits die Summe an phosphorylierten Produkten und Phosphat im Stroma konstant gehalten (Lilley et al. 1977). Im Fließgleichgewicht der CO_2 -Fixierung werden daher die Metabolit Spiegel im Stroma durch das Gleichgewicht zweier Geschwindigkeitskonstanten repräsentiert: der Konstanten der CO_2 -Fixierung und der des Metabolittransports über die Hüllmembran.

Es ist bereits länger bekannt, daß hohe Phosphatkonzentrationen zu einer Verlängerung der Verzögerungsphase und zu einer Hemmung der CO_2 -Fixierung führen (Cockburn et al. 1967). Dies kann dadurch erklärt werden, daß über die Stimulierung des Phosphattransports durch eine hohe Phosphatkonzentration es zu einem hohen gegenläufigen Austransport von Triosephosphaten und 3-PGA kommt. Dies bedingt eine Metabolitverarmung im Chloroplasten und führt damit zu einer Hemmung der CO_2 -Fixierung (Lilley et al. 1977).

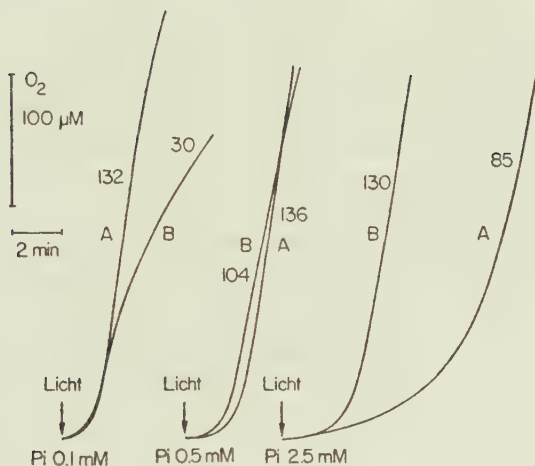


Abb. 35 CO_2 -abhängige O_2 Entwicklung bei verschiedenen Phosphatkonzentrationen im Medium. Die Chloroplastenkonzentration war 0.064 mg Chl./ml. A Kontrolle, B +1 mM PLP (Inkubation für 2 min vor der Belichtung). Die Zahlen entsprechen den Raten der O_2 Entwicklung in $\mu M O_2 / mg Chl. \cdot h$.

Abb. 35 zeigt die Abhängigkeit der CO_2 -Fixierung von der Phosphatkonzentration und den Einfluß von PLP. Durch die Kontrolllexperimente wird der beschriebene Einfluß von Phosphat auf die Verzögerungsphase und die Rate der CO_2 -Fixierung dokumentiert. Wie weiter gezeigt wird, können diese Effekte durch PLP rückgängig gemacht werden. Zugabe von PLP zu dem 2 mM Phosphat enthaltenden Ansatz führt zu einer Verkürzung der Verzögerungsphase und zu einer Zunahme der O_2 Entwicklungsrate. Im Phosphatoptimum bei einer Phosphatkonzentration von 0.5 mM wird durch PLP die Rate der

TABELLE XII

EINFLUSS VON ANORGANISCHEM PHOSPHAT UND PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT AUF DIE METABOLITSPIEGEL IM CHLOROPLASTEN

Experiment der Abb. 35. Die Werte wurden nach 4 min Belichtung gemessen.
Das Volumen des Stromaraumes betrug 25 μ l.

	Phosphat (mM)	0.5	0.5	2.0	2.0
	Pyridoxal 5'-phosphat (mM)	0	1.0	0	1.0
Metabolitkonzentration im Stroma (mM)					
Triosephosphate	0.14	0.13	~0	0.18	
3-Phosphoglycerat	4.44	3.82	~0	3.69	
Hexose- und Heptosemonophosphate	1.96	1.58	0.10	1.85	
Fructosebisphosphat	0.29	0.29	~0	0.37	
Seduheptulosebisphosphat	0.11	0.08	~0	0.10	
Pentosemonophosphat	0.08	0.11	~0	0.02	
Ribulosebisphosphat	0.46	0.57	0.06	0.30	
ATP/ADP	0.42	0.71	1.75	0.98	

O_2 Entwicklung nur wenig gehemmt, während bei einer sub-optimalen Phosphatkonzentration von 0.1 mM die O_2 Entwicklung jedoch entsprechend den in Abb. 34 dargestellten Experimenten durch PLP stark gehemmt wird.

Tabelle XII belegt diesen Einfluß von Phosphat und PLP auf den Metabolitspiegel der Chloroplasten. Bei einer für die CO_2 -Fixierung optimalen Phosphatkonzentration von 0.5 mM bleibt der Metabolitspiegel in Chloroplasten durch Zugabe von PLP unbeeinflusst. Durch eine höhere Phosphatkonzentration von 2 mM kommt es über die Stimulierung des Phosphateintransports und des gegenläufigen Austransports von DHAP und 3-PGA zu einer Metabolitverarmung und damit zu der beobachteten Hemmung der CO_2 -Fixierung. Durch Zugabe von PLP wird die Hemmung durch Phosphat vollständig aufgehoben und die Chloroplasten weisen wiederum ein normales Metabolitmuster auf.

Diese Ergebnisse lassen sich durch eine spezifische Wechselwirkung zwischen PLP und dem Phosphattranslokator erklären. Infolge einer Hemmung des Translokators wird bei einem hohen Phosphatangebot der Eintransport von Phosphat so stark eingeschränkt, daß der Austransport von Triosephosphaten und 3-PGA verhindert wird. Damit ist für den Stromaraum der Aufbau eines für die CO_2 -Fixierung optimalen Metabolitspiegels gewährleistet. Diese Daten zeigen zudem, daß für eine optimale Geschwindigkeit der Überalles Reaktion der CO_2 -Fixierung die Geschwindigkeiten der CO_2 -Fixierung und der Phosphattranslokation aufeinander abgestimmt sein müssen.

3.4.2. Experimente mit 2,4,6-Trinitrobenzoesulfonsäure

Zur weiteren Charakterisierung des Phosphattransports wurde 2,4,6-Trinitrobenzoesulfonsäure (TNBS) eingesetzt, ein Reagenz, das wie Pyridoxal 5'-phosphat selektiv mit Lysinresten in Proteinen reagiert (Okuyama und Satake 1960). Lysin reagiert in dieser Reaktion als Nucleophil mit dem aromatischen Ring der Trinitrobenzoesulfonsäure. Abb. 36 zeigt, daß TNBS ein sehr effektiver Inhibitor des Phosphattransports ist. Nach 3 - 5 minütiger Inkubationsdauer wurde das volle Ausmaß der Hemmung erreicht. In dem in Abb. 37 gezeigten Experiment wurde die Wirkung von TNBS auf die Transportgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration untersucht. Mit den kinetischen Daten wurde der Hemmtyp nach Lineweaver-Burk (1934) bestimmt

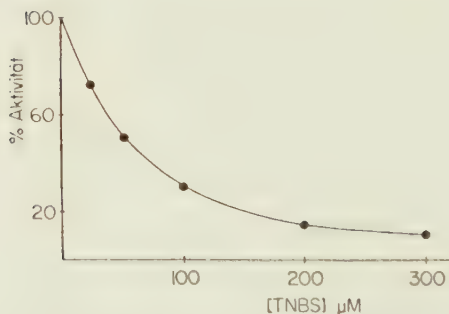


Abb. 36 Hemmung des Phosphattransports durch TNBS. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden mit den angegebenen Konzentrationen an TNBS für 10 min vorinkubiert. Messung des Phosphattransports wie in den Methoden beschrieben. Die Kontrollrate war 43 μ Mol/mg Chl. $\cdot$ h.

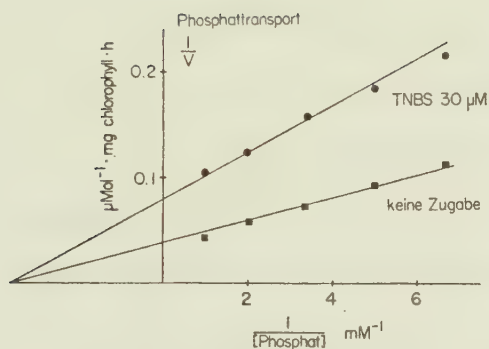


Abb. 37 Hemmung des Phosphattransports durch TNBS in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden mit 30 μM TNBS für 7 min vorinkubiert und der Phosphattransport wie in den Methoden beschrieben gemessen.

TABELLE XIII

HEMMUNG DES PHOSPHATTRANSPORTS DURCH TNBS UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Intakte Chloroplasten (0.15 mg/ml) wurden vor der Inkubation mit TNBS (0.2 mM für 5 min) mit den angegebenen Substraten (10 mM für 10 min) vorinkubiert. Weiter wurde wie in der Legende zu Tab. IV verfahren. Mittelwerte aus 4 Experimenten.

Zugaben	Phosphattransport $\mu Mol \cdot (mgChl.)^{-1} \cdot h^{-1}$	Hemmung (%)
Kontrolle	43	-
TNBS	15	64
Phosphat, dann TNBS	29	33
3-PGA, dann TNBS	27	36
2-PGA, dann TNBS	16	63

und zeigt, daß TNBS den Phosphattransport nicht-kompetitiv hemmt.

Weiterhin wurde untersucht, in welcher Weise die Substrate des Translokators die Hemmung des Transports durch TNBS zu reduzieren vermögen. Durch 3-PGA und Phosphat wird der Translokator spezifisch vor der Hemmung geschützt (Tabelle XIII) während 2-PGA keinen Schutzeffekt gegenüber der Hemmung aufweist. Der mit TNBS reagierende Aminosäurerest des Translokators ist also an einer spezifischen Bindung der Substrate beteiligt und kann damit im aktiven Zentrum des

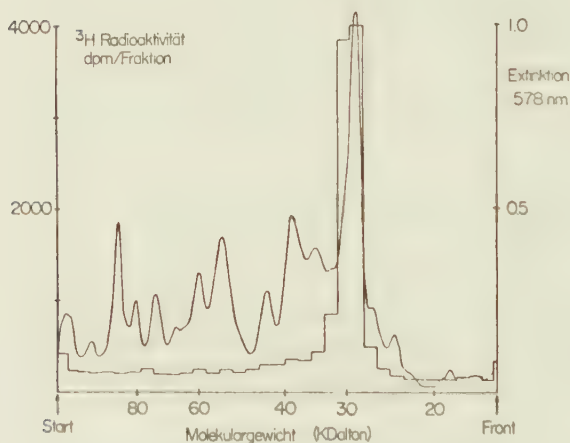


Abb. 38 SDS-PAGE der Hüllmembranpolypeptide und die Markierung mit TNBS/ $[\text{}^3\text{H}]\text{NaBH}_4$. Die Inkubation der intakten Chloroplasten erfolgte mit 0.4 mM TNBS für 10 min, die Markierung mit $[\text{}^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ (1.5 mM für 10 min) und die weitere Aufarbeitung wie in den Methoden beschrieben. Die durchgezogene Linie entspricht den Densitogrammen der Membranpolypeptide, die durchgezogene Kästchenlinie der Markierung mit TNBS/ $[\text{}^3\text{H}]\text{NaBH}_4$.

Translokators lokalisiert werden.

In dem in Abb. 38 dargestellten Experiment wurde die Bindung von TNBS an die Proteine der Hüllmembran gemessen. Dazu wurden die Chloroplasten zuerst mit TNBS inkubiert und anschließend der gebundene Trinitrophenylrest durch Zugabe von $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ radioaktiv markiert.

Parrot und Shifrin (1977) beschrieben, daß die Reduktion von TNBS mit NaBH_4 zu einer irreversiblen Bildung eines 1:1 bzw. eines 1:2 Produktes zwischen dem Trinitrophenylrest und Hydridionen führt. Durch die Reaktion mit radioaktiv markiertem $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ kann so eine Markierung in den gebundenen Trinitrophenylrest eingeführt werden.

Der Einbau von TNBS in die Membranproteine erfolgte sehr

TABELLE XIV

EINBAU VON 2,4,6-TRINITROBENZONESULFONSÄURE (TNBS) IN DAS 29 000 DALTON MEMBRANPROTEIN UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Intakte Chloroplasten (0.5 mg/ml) wurden vor der Zugabe von TNBS (0.4 mM für 4 min) mit den angegebenen Substraten (10 mM für 10 min) inkubiert. Die Markierung mit $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ und die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in den Methoden beschrieben.

Zugaben vor der Inkubation mit TNBS/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$	dpm	% der Kontrolle
Keine	4150	100
Phosphat	1850	45
3-PGA	2450	58
2-PGA	4200	101

spezifisch. Nur das 29 000 Dalton Protein trug eine radioaktive Markierung. Eine Vorinkubation der Chloroplasten mit 3-PGA und Phosphat vor der Zugabe von TNBS führt zu einer markanten Verminderung des Radioaktivitätseinbaus in das 29 000 Dalton Protein (Tabelle XIV). Durch die Vorinkubation mit 2-PGA wurde der Einbau von TNBS nicht beeinflusst. Die Schutzeffekte der Substrate gegenüber dem Einbau in das 29 000 Dalton Protein lassen sich also mit den Effekten gegenüber der Hemmung des Transports durch TNBS korrelieren. Dies kann als weiterer Beleg dafür gelten, daß das 29 000 Dalton Protein mit dem Phosphattranslokator identisch ist.

Aus den Markierungsexperimenten mit den SH spezifischen Reagenzien NEM und pCMS und den für Lysin spezifischen Reagenzien PLP und TNBS läßt sich ersehen, daß TNBS und PLP sehr selektiv mit einem Polypeptid der Hüllmembran reagieren, während die Reaktion mit NEM bzw. pCMS weitere Membranproteine erfaßt. Dieser Selektivitätsunterschied kann auch gezeigt werden, indem man die durch obige Inhibitoren bewirkte Hemmung eines weiteren in der Hüllmembran lokalisierten Transportsystems, des Dicarboxylattranslokators (Lehner und Heldt 1978), mit der Hemmung des Phosphattransportsystems vergleicht. Tabelle XV zeigt, daß durch Konzentrationen an TNBS und PLP, die den Phosphat- bzw. 3-PGA Transport zu 70% - 80% hemmen, der Dicarboxylattransport unbeeinflusst bleibt. Durch pCMS jedoch wird neben dem Phosphat- und 3-PGA Transport auch der Transport von Malat inhibiert.

TABELLE XV

HEMMUNG DES PHOSPHAT- 3-PGA- UND DICARBOXYLAT-TRANSPORTS DURCH p-(CHLORMERCURI)-
BENZOE SäURE (pCMS), PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT (PLP) UND 2,4,6-TRINITROBENZOE SÜLFON-
SÄURE (TNBS)

Die Chloroplastenkonzentration betrug 0.09 mg Chl./ml. Die Kontrollraten
($\mu\text{Mol} \cdot (\text{mg Chl.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) waren: Phosphat (0.4 mM) 32; 3-PGA (0.32 mM) 35;
L-Malat (0.17 mM) 6.

Inhibitor	Präinkubationszeit (min)	Konzentration (μM)	Hemmung des Transports (%)		
			Phosphat	3-PGA	L-Malat
TNBS	7	100	50	46	0
	7	200	70	72	0
pCMS	10	100	78	84	36
	10	300	91	97	50
PLP	45	280	72	81	0
	45	750	86	88	6

Teile der mit TNBS erzielten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Flügge und Heldt 1978).

3.4.3. Experimente mit argininspezifischen Reagenzien

Zur selektiven Modifizierung von Argininresten in Proteinen werden vornehmlich die beiden 1,2 Diketone Phenylglyoxal (Takahashi 1968, 1977) und Butandion (Riordan 1973) eingesetzt. Mit diesen Reagenzien, die unter milden Bedingungen (pH 7 - 8) mit der Guanidinogruppe des Arginins reagieren, konnte die Beteiligung eines Argininrestes an der Substrat- oder Cofaktorbindung in zahlreichen Enzymen nachgewiesen werden, so z.B. für Carboxypeptidase (Riordan 1973), Ribonuclease (Patthy und Smith 1975), Alkoholdehydrogenasen

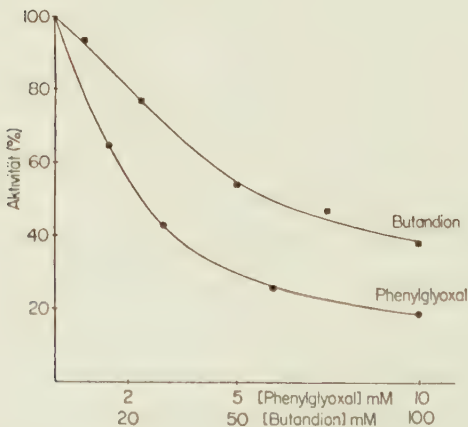


Abb. 39 Hemmung des Phosphattransports durch Butandion und Phenylglyoxal. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Reagenz für 45 min vorinkubiert. Die Messung des Phosphattransports erfolgte wie in den Methoden beschrieben. Die Kontrollrate war 34 μ Mol/mg Chl. $\cdot$ h.

TABELLE XVI

EINFLUSS VON INHIBITOREN AUF DIE BINDUNG VON $[^{203}\text{Hg}]_{\text{pCMS}}$
AN CHLOROPLASTEN

Experimentelle Bedingungen wie in der Legende zu Abb. 40.
Weitere Erläuterungen im Text.

Inhibitor	Konzentration (mM)	Aktivität (%)	$[^{203}\text{Hg}]_{\text{pCMS}}$ gebunden (nMol/0.03 mg Chl.)
pCMS	0	100	1.03
	0.05	53	0.76
	0.20	13	0.39
	0.50	3	0.27
Butandion	0	100	0.67
	25	76	0.72
	50	53	0.73
	100	37	0.73
Phenylglyoxal	0	100	0.63
	3	45	0.62
	5	36	0.63
	12	16	0.63

(Lange et al. 1974), Creatinkinase (Borders und Riordan 1975) und die mitochondriale ATPase (Marcus et al. 1976).

Phenylglyoxal (PGO) und Butandion sind ebenfalls Inhibitoren des Phosphattransports in Chloroplasten. Die Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung zeigt Abb. 39. Wie ausgeführt, sind Butandion und PGO argininspezifische Reagenzien. Eine Bindung und Hemmung durch ein SH-Reagenz wie pCMS sollte daher durch diese Reagenzien nicht beein-

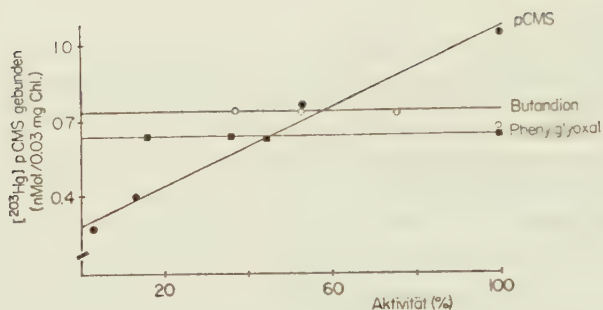


Abb. 40 Korrelation der Transportheftung durch pCMS, Butandion und Phenylglyoxal mit der Bindung von $[^{203}\text{Hg}]$ pCMS. Die Chloroplastenkonzentration war 0.1 mg/ml, das Inkubationsvolumen 0.3 ml. Weitere Erläuterungen im Text.
Daten der Tab. XVI.

flußt werden. Tabelle XVI und Abb. 40 zeigen ein dem in Tabelle III und Abb. 9 dargestellten analoges Experiment. Hier wurde der Einfluß der Vorinkubation mit Butandion und PGO auf die Bindung des SH-Reagenzes pCMS geprüft. Chloroplasten wurden mit steigender Konzentration an pCMS, Butandion und PGO vorinkubiert und in parallelen Ansätzen die Hemmung des Phosphattransports (Tabelle XVI, Spalte 3) und die Bindung von $[^{203}\text{Hg}]$ pCMS an die Chloroplasten gemessen (Tabelle XVI, Spalte 4). Die Korrelation dieser beiden Messungen zeigt Abb. 40. Die Bindung von $[^{203}\text{Hg}]$ pCMS wird durch die Vorinkubation mit steigenden Konzentrationen an kaltem pCMS zunehmend herabgesetzt. Im Gegensatz dazu wird die Bindung von $[^{203}\text{Hg}]$ pCMS durch Butandion und Phenylglyoxal, in der für die Hemmung des Transports ausreichenden Konzentration eingesetzt, nicht beeinflusst. Demnach verläuft die

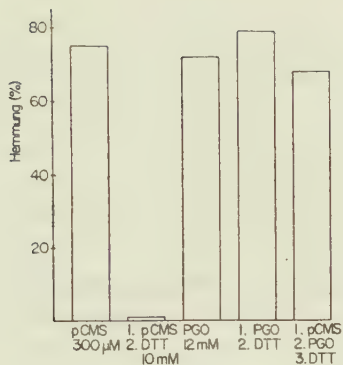


Abb. 41 Einfluß von pCMS auf die Hemmung des Phosphat-
transports durch PGO. Die Inkubationszeiten für pCMS und
DTT betrugen 5 min, für PGO 45 min. Die Messung des Phos-
phattransports erfolgte wie in den Methoden beschrieben.
Die Chloroplastenkonzentration war 0.1 mg/ml, die Kon-
trollrate 32 µMol/mg Chl.·h.

Hemmung des Phosphattransports durch Butandion und Phenyl-
glyoxal als argininspezifische Reagenzien einerseits und
pCMS als SH-Reagenz andererseits über eine Reaktion mit
gegenseitig nicht zugänglichen Aminosäureresten. Dies kann
auch mit einem Experiment (Abb. 41) gezeigt werden, das
dem in Abb. 18 dargestellten analog ist, und für dessen
Interpretation die auf Seite 42 angestellten Überlegungen
gelten. Im Gegensatz zum pCMS kann die Hemmung des Trans-
ports durch DTT nicht wieder aufgehoben werden. Nach pCMS/PGO
Inkubation und anschließender Zugabe von DTT bleibt der
Transport inaktiviert. Dies belegt, daß die Inaktivierung
durch pCMS bzw. PGO zwei voneinander unabhängige Reaktio-
nen sind und die für pCMS reaktive SH-Gruppe nicht an der

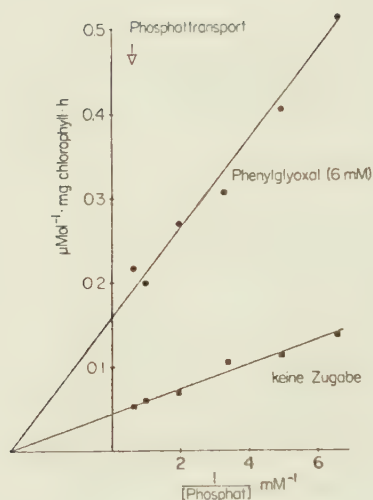


Abb. 42 Hemmung des Phosphattransports durch PGO in Abhängigkeit von der Phosphatkonzentration. Intakte Chloroplasten (0.1 mg/ml) wurden für 45 min mit 6 mM PGO vorinkubiert und der Phosphattransport wie in den Methoden beschrieben, gemessen.

durch PGO verursachten Inaktivierung des Phosphattransports beteiligt ist.

Die kinetische Analyse der Transporthemmung durch PGO bei steigenden Phosphatkonzentrationen weist PGO, wie zuvor auch schon für pCMS und TNBS gezeigt, als einen nicht-kompetitiven Inhibitor des Transports aus (Abb. 42).

Ferner wurde geprüft, ob der für PGO reaktive Argininrest als Kandidat für die Bindung der Substrate des Phosphattransports, 3-PGA und Phosphat, in Frage kommt. Hierzu wurde der Einfluß der Substrate auf die Hemmung des Phosphat-

TABELLE XVII

HEMMUNG DES PHOSPHATTRANSPORTS DURCH PHENYLGLYOXAL UND DER EINFLUSS VON SUBSTRATEN

Intakte Chloroplasten (0.15 mg/ml) wurden mit den angegebenen Substraten (10 mM für 10 min) in einem ionenfreien Sorbit-HEPES Medium inkubiert. Nach der Inkubation mit PGO (10 mM für 30 min) wurde wie in der Legende zu Tab. IV verfahren. Mittelwerte aus 3 Experimenten.

Zugaben	Phosphattransport $\mu\text{Mol} \cdot (\text{mg Chl.})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Hemmung (%)
Kontrolle	36	-
PGO	11	68
Phosphat, dann PGO	24	33
3-PGA, dann PGO	13	63
2-PGA, dann PGO	23	34

transports geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle XVII dargestellt. Es zeigt sich ein spezifischer Substratschutzeffekt durch 3-PGA und Phosphat, während durch 2-PGA die Hemmung des Transports durch PGO unbeeinflusst blieb. Der Schutz kann also durch eine spezifische Wechselwirkung der Substrate mit dem an ihrer Bindung beteiligten Argininrest im aktiven Zentrum des Phosphattranslokators erklärt werden.

3.4.4. Der Einfluß von Inhibitoren des Phosphattranslokators auf den Einbau von Pyridoxal 5'-phosphat, 2,4,6-Trinitrobenzoesulfonsäure und Pyridoxal in das 29 000 Dalton Membranpolypeptid

Mit den folgenden Experimenten sollte geklärt werden, in welcher Weise die Vorinkubation der Chloroplasten mit den beschriebenen Inhibitoren des Phosphattranslokators einen Einfluß auf den Einbau von PLP und TNBS in das 29 000 Dalton Membranpolypeptid aufweist. Es sollte damit geprüft werden, welche der verwendeten Inhibitoren eine gleiche Spezifität bezüglich der für PLP und TNBS reaktiven Lysin-Gruppe des Translokators besitzen.

Die Chloroplasten wurden mit einer jeweilig für eine maximale Hemmung benötigten Inhibitorkonzentration inkubiert und anschließend gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit PLP/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ bzw. TNBS/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ zur spezifischen Markierung des 29 000 Dalton Membranpolypeptids. Die eingebaute Radioaktivität in dieses Protein wurde anschließend gemessen. Wurde der Einfluß von TNBS bzw. PLP auf die Markierung mit PLP/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ geprüft, wurde vor dem Waschschritt mit kaltem NaBH_4 reduziert. Auf diese Weise wurde sichergestellt, daß die Markierung auf den Einbau des nach dem Waschschritt eingesetzten Inhibitors zurückzuführen war.

Die Ergebnisse werden in Tabelle XVIII und Tabelle XIX zusammengefaßt; Tabelle XX zeigt den Einfluß der Vorinkubation mit TNBS und PLP auf die Proteinmarkierung mit PAL.

TABELLE XVIII

EINBAU VON PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT (PLP) IN DAS 29 000 DALTON MEMBRANPROTEIN UND DER EINFLUSS VON INHIBITOREN DES PHOSPHATTRANSPORTS

Die Markierung intakter Chloroplasten (0.5 mg/ml) erfolgte mit PLP (0.8-1.5 mM für 15-40 min)/[³H]NaBH₄. Bei der Vorinkubation mit TNBS wurden die Chloroplasten vor dem Waschschrift mit NaBH₄ (3 mM für 10 min) behandelt. Weitere Erläuterungen im Text.

Inhibitor vor der Inkubation mit PLP/[³ H]NaBH ₄	dpm	% der Kontrolle	Hemmung des Phosphattransports
-	1650	100	-
DABS (12 mM für 45 min)	470	28	91
-	2410	100	-
PGO (15 mM für 45 min)	1980	82	83
-	4180	100	-
pCMS (1 mM für 15 min)	3430	69	100
-	3199	100	-
TNBS (1 mM für 20 min)	1038	32	93

TABELLE XIX

EINBAU VON 2,4,6-TRINITROBENZENSULFONSAURE (TNBS) IN DAS 29 000 DALTON MEMBRANPROTEIN UND DER EINFLUSS VON INHIBITOREN DES PHOSPHATTRANSSPORTS

Die Markierung intakter Chloroplasten (0.5 mg/ml) erfolgte mit TNBS (0.5-1.0 mM für 7-15 min)/[^3H]NABH $_4$. Bei der Vorinkubation mit PLP wurden die Chloroplasten vor dem Waschschritt mit NABH $_4$ (4 mM für 10 min) behandelt. Weitere Erläuterungen im Text.

Inhibitor vor der Inkubation mit TNBS/[^3H]NABH $_4$	dpm	% der Kontrolle	Hemmung des Phosphattransports
-	2080	100	-
DABS (12 mM für 45 min)	580	28	91
-	2210	100	-
PGO (15 mM für 45 min)	1920	86	83
-	1720	100	-
PCMS (1 mM für 15 min)	1050	61	100
-	3610	100	-
PLP (2 mM für 30 min)	970	27	93

TABELLE XX

EINBAU VON PYRIDOXAL (PAL) IN DAS 29 000 DALTON MEMBRANPROTEIN UND DER EINFLUSS VON PYRIDOXAL 5'-PHOSPHAT (PLP) UND 2,4,6-TRINITROBENZOLSULFONSAURE (TNBS)

Chloroplasten (0.5 mg/ml) wurden mit den angegebenen Konzentrationen an PLP und TNBS inkubiert. Nach der Zugabe von 6 mM NaBH₄ wurden die Chloroplasten gewaschen, resuspendiert und mit PAL (7.5 mM für 45 min) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Reduktion mit [³H]NaBH₄ (0.5 mM für 10 min) und die weitere Aufarbeitung wie in den Methoden beschrieben.

Inhibitor vor der Inkubation mit PAL/[³ H]NaBH ₄	dpm	% der Kontrolle	Hemmung des Phosphattransports
-	2300	100	-
PLP (2 mM für 30 min)	650	28	91
-	2100	100	-
TNBS (1.2 mM für 20 min)	650	31	92

Aus den erhaltenen Werten läßt sich Folgendes ersehen:

- a) Vorinkubationen mit DABS, PGO und pCMS beeinflussten den Einbau von PLP und TNBS in gleicher Weise.
- b) Der Einbau von TNBS wurde durch PLP in gleichem Ausmaß wie der Einbau von PLP und TNBS und der Einbau von PAL durch TNBS und PLP herabgesetzt.
- c) Vorinkubationen mit PGO bzw. pCMS setzten den Einbau von PLP bzw. TNBS auf einen Wert von 82 - 86 % bzw 61 - 69 % der Kontrolle herab.
- d) Durch eine Vorinkubation mit den lysinspezifischen Inhibitoren PLP, PAL und TNBS wie auch durch DABS wurden die entsprechenden Markierungen des 29 000 Dalton Proteins auf 24 - 32 % reduziert.

Mit den eingesetzten Konzentrationen an Inhibitor während der Vorinkubation wurde eine 83 - 93 %ige Hemmung des Phosphattransports erreicht. Der gemessene Einbau beinhaltet also noch die anschließend besetzte Restaktivität, daneben möglicherweise noch einen Anteil unspezifischer Bindung. Damit sollten die tatsächlichen Werte für den Schutz vor der entsprechenden Markierung höher liegen.

Trotz dieser Einschränkungen kann geschlossen werden, daß der gleiche Aminosäurerest des 29 000 Dalton Proteins, augenscheinlich ein Lysinrest, mit den Inhibitoren PLP, TNBS, PAL und DABS reagiert. Da PGO den Einbau von PLP und TNBS nur geringfügig beeinflußt, reagiert PGO mit einer anderen Gruppe als dem Lysinrest - anzunehmenderweise mit einem für PGO spezifischen Argininrest.

Aus den Ergebnissen läßt sich ferner ersehen, daß pCMS den

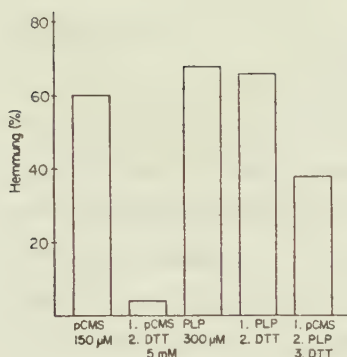


Abb. 43 Einfluß von pCMS auf die Hemmung des Phosphat- transports durch PLP. Die Inkubationszeiten für pCMS und DTT betrugen jeweils 5 min, für PLP 45 min. Die Chloro- plastenkonzentration war 0.1 mg/ml, die Kontrollrate 35 µMol/mg Chl.·h. Die Messung des Phosphattransports er- folgte wie in den Methoden beschrieben.

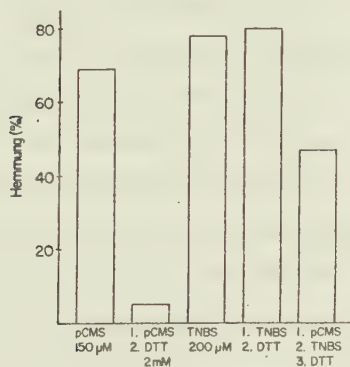


Abb. 44 Einfluß von pCMS auf die Hemmung des Phosphat- transports durch TNBS. Die Inkubationszeit für pCMS und DTT betrug jeweils 5 min, für TNBS 7 min. Die Chloro- plastenkonzentration war 0.1 mg/ml, die Kontrollrate 40 µMol/mg Chl.·h. Die Messung des Phosphattransports erfolgte wie in den Methoden beschrieben.

Lysinrest des Translokators teilweise vor der Reaktion mit TNBS und PLP zu schützen vermag. Dies kann auch durch Experimente belegt werden, die analog zu denen in den Abbildungen 18 und 41 dargestellten Versuchen durchgeführt wurden. Die Abbildungen 43 und 44 zeigen, daß der mit PLP und TNBS inhibierte Phosphattransport im Gegensatz zur pCMS Hemmung nicht durch Zugabe von DTT reaktiviert werden kann. Im Fall der Inkubation mit pCMS/PLP bzw. pCMS/TNBS wird nach DTT Zugabe nicht der volle Wert der jeweiligen Kontrollhemmung erreicht.

Diese Befunde könnten dadurch erklärt werden, daß pCMS, TNBS und PLP unter teilweiser überlappender Spezifität mit reaktiven Aminosäureresten des Translokators reagieren. Die andere, wahrscheinlichere Erklärung beläßt dem SH-Reagenz pCMS und den Lysinreagenzien PLP und TNBS ihre jeweilige Spezifität und berücksichtigt die Möglichkeit, daß die Reaktion des voluminösen Inhibitors pCMS mit einer SH-Gruppe zu einer Konformationsänderung des Translokators führt. Damit wäre der Lysinrest, der auch als möglicher Reaktionspartner für NEM in Betracht kommt (siehe unter 4.3.2.), für PLP und TNBS nicht mehr zugänglich, und obiger Schutzeffekt trotz der Reaktion von pCMS mit einem anderen Aminosäurerest verständlich.

4. DISKUSSION

4.1. Isolierung und Charakterisierung der Hüllmembranen

In jüngster Zeit wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Methoden zur Isolierung der Hüllmembranen mittels eines diskontinuierlichen Saccharose Gradienten beschrieben (Douce et al. 1973, Poincelot 1973, Poincelot und Day 1974, Mackender und Leech 1974). Es muß jedoch betont werden, daß keine dieser Methoden es gestattet, die äußere von der primär interessierenden inneren Hüllmembran, welche die eigentlich funktionelle Permeabilitätsschranke darstellt, abzutrennen.

In kontinuierlichen Saccharose Gradienten und in entsprechend angeordneten diskontinuierlichen Gradienten finden sich zwar 2 Banden, die von Poincelot (1973) als "light" und "heavy fraction" bezeichnet werden. Poincelot und Day (1974) meinen elektronenoptische Hinweise zu besitzen, daß die "heavy fraction" aus intakten, von einer Doppelmembran umschlossenen Vesikeln, die "light fraction" jedoch aus größtenteils unvollständigen, nur mit einer Einfachmembran umgebenen Membranvesikeln besteht. Es muß jedoch angenommen werden, daß die die Vesikel der "light fraction" begrenzenden Membranen nicht einheitlich nur aus der äußeren oder inneren Hüllmembran bestehen, sondern, wie von Mackender und Leech (1974) ausgeführt, ein Gemisch beider Membranen repräsentieren. Dies bestätigt auch die Tatsache, daß durch SDS-PAGE kein Unterschied bezüglich des Polypeptidmusters festgestellt werden konnte.

Aus den Untersuchungen über die Verteilung der Leitenzyme ergibt sich, daß Hüllmembranen quasi frei von Verunreinigungen durch Enzyme des Stromaraumes oder des Thylakoidmembransystems isoliert werden können. Zudem ist die Konzentration an Mg^{++} -abhängiger ATPase hoch genug, um als Leitenzym für die Membranfraktion dienen zu können.

4.2. Der Phosphattransport unter dem Einfluß aminosäurespezifischer Reagenzien

Ein Ziel dieser Arbeit bestand in der näheren Charakterisierung des Phosphattranslokators über die Beschreibung der Natur seines aktiven Zentrums als dem Ort der Substratbindung. Hierzu dienten gruppenspezifische und kovalent reagierende Reagenzien, deren Einfluß auf die Aktivität des Transportsystems untersucht wurde.

Die Untersuchungen mit verschiedenen SH-Reagenzien Mersalyl, pCMS, DTNB und NEM zeigten, daß durch die Modifizierung einer SH-Gruppe des Translokators die Transportaktivität gehemmt wird. Die Hemmung erwies sich pH-abhängig, wie es bei Reaktionen zwischen SH-Reagenzien und Proteinen meist der Fall ist. Dies ist auf eine Ionisierung sowohl des Reagenzes als auch der reaktiven SH-Gruppe im Protein zurückzuführen. In einem großen Teil der Fälle begünstigt ein höherer, über dem pK-Wert der SH-Gruppe liegender pH die Geschwindigkeit und das Ausmaß der beobachteten Hemmung. Es ist vorstellbar, daß die $R-S^-$ Gruppe die reaktive Spezies darstellt und Protonen mit dem SH-Reagenz um die Bindung an die $R-S^-$ Gruppe kompetitieren. Dies scheint für

das Reagenz NEM zu gelten, das nur bei einem pH > 8 eine nennenswerte Hemmung des Phosphattransports aufweist. Die Untersuchungen mit NEM wurden daher bei einem pH von 8.4 durchgeführt. Dieser alkalische pH begünstigt allerdings eine Hydrolyse des Imids zum entsprechenden Säureamid. Die Inkubationszeit für diesen Inhibitor betrug jedoch maximal 45 min. Es kann abgeschätzt werden, daß auch bei pH 8.4 in dieser Zeit weniger als 10 % des NEM hydrolysiert werden (Gregory 1955). Die organischen Quecksilberverbindungen und DTNB weisen demgegenüber eine gegensätzliche pH-Abhängigkeit auf. Das Ausmaß der Hemmung nimmt hier mit zunehmendem pH ab. Dies kann dadurch erklärt werden, daß in einem alkalischeren Medium das Protein zunehmend negativ geladen wird, und die negativ geladenen SH-Reagenzien pCMS und DTNB, die nach dem in Abb. 9 dargestellten Experiment mit der gleichen SH-Gruppe des Translokators reagieren, abstoßt. Zudem scheinen hier OH⁻ Ionen mit den SH-Gruppen von Proteinen um das Reagenz zu kompetitieren, sodaß im Endeffekt die aktuelle Konzentration an freiem Reagenz herabgesetzt wird.

Diese eingesetzten Reagenzien zeichnen sich durch eine relative Spezifität für SH-Gruppen in Proteinen aus. Im Gegensatz hierzu kann p-Diazobenzoesulfonsäure auf Grund seiner ausgeprägten Reaktivität gegenüber einer Anzahl von Aminosäuren nicht als gruppenspezifisches Reagenz bezeichnet werden. Da DABS jedoch membranimpermeabel ist, bestand die Möglichkeit, es - unter der Voraussetzung einer Reaktion mit dem Translokator - zur Markierung des Transport-

systems von der Außenseite der Membran einzusetzen.

Die Hemmung des Phosphattransports durch DABS wurde untersucht und es zeigte sich, daß die Inaktivierungsreaktion einer Kinetik pseudo-erster Ordnung folgt. Die Hemmung des Phosphattransports wird zudem durch eine stöchiometrische 1:1 Reaktion zwischen einem Molekül DABS und einem Aminosäurerest im aktiven Zentrum des Translokators bewirkt (Abb. 17). Über die Natur dieses Aminosäurerestes konnte so noch keine Aussage gemacht werden. Doch erlaubt das in Abb. 18 dargestellte Experiment den Schluß, daß die oben charakterisierte SH-Gruppe nicht an der Inaktivierung durch DABS beteiligt ist. Um zu einer weiterführenden Aussage über die Natur der Substratbindungsstelle im aktiven Zentrum des Translokators zu kommen, wurde die Überlegung zu Grunde gelegt, daß die Wechselwirkung zwischen dem Translokator und seinen Substraten elektrostatischer Natur ist. Daher sollte die Energie für die Bindung der anionischen Substrate Phosphat und 3-PGA durch eine Wechselwirkung mit positiv geladenen funktionellen Aminosäureresten im aktiven Zentrum des Phosphattranslokators bereitgestellt werden. In einer Anzahl von Fällen (Yang und Schwert 1972, Adams et al. 1973, Zeppezauer et al. 1975, Rasched et al. 1974) wurden als Bindungsstellen für negativ geladene Substrate die kationischen Gruppen von Lysin bzw. Arginin identifiziert.

Zur selektiven Modifizierung von Argininresten können Phenylglyoxal (PGO) (Takahashi 1977, 1968), für die Markierung von Lysinresten Pyridoxal 5'-phosphat (PLP) (Cooper und

Reich 1972) und 2,4,6-Trinitrobenzoesulfonsäure (TNBS) (Okuyama und Satake 1960) eingesetzt werden.

Sowohl die lysinspezifischen Reagenzien PLP und TNBS - im weiteren auch Pyridoxal (PAL) - als auch die argininspezifischen Reagenzien PGO und Butandion erwiesen sich als Inhibitoren des Phosphattransports (Abb. 20, 36 und 39). Die Transporthemmung durch PLP wurde näher charakterisiert. Sie verläuft über eine 1:1 Reaktion zwischen PLP und einem Lysinrest des Translokatorproteins. Die Bindung erfolgt über die Ausbildung einer Schiffschen Base und ist eine reversible Reaktion. Die Inaktivierungsreaktion folgt einer Kinetik pseudo-erster Ordnung (Abb. 20), wobei die Gesamtreaktion jedoch zweiter Ordnung ist mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_{+1} = 183 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Die Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation der Schiffschen Base, k_{-1} , wurde zu 0.027 min^{-1} bestimmt, wobei jedoch mit diesen Reaktivierungsexperimenten im Vergleich zur Ausgangsaktivität nur ein 90 %iger Wert erreicht wurde (Abb. 23). Auffallender ist diese Diskrepanz zwischen dem erreichten Endwert während der Reaktivierung und der Ausgangsaktivität vor allem jedoch für die Experimente mit PAL. Trotz eines Wertes von 0.030 min^{-1} für die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion, die mit der für PLP erhaltenen Konstante von 0.027 min^{-1} vergleichbar ist, wurde hier nur eine 45 %ige Reaktivierung erreicht (Abb. 25). Als Gründe hierfür müssen sekundäre Veränderungen in der Struktur des Translokators angenommen werden. Bei vergleichbaren Werten für die Geschwindigkeitskonstan-

ten der Dissoziation der Schiffischen Base zwischen PLP und PAL und dem Translokator belegen die durch die verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten der Hinreaktion ($183 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ für PLP, $3.2 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ für PAL) bedingten Dissoziationskonstanten von $1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ für PLP bzw. 7.5×10^{-3} für PAL die unterschiedliche Reaktivität beider Reagenzien. Die schwächer ausgeprägte Reaktivität von PAL kann dadurch erklärt werden, daß PAL in Lösung zum großen Teil als unreaktives inneres Halbacetal vorliegt (Metzler und Snell 1955). Die herabgesetzte Reaktivität von PAL kann somit auf eine verminderte Konzentration an aktivem Aldehyd zurückgeführt werden.

Die unter 3.4.4. beschriebenen Experimente zeigen zudem, daß beide Reagenzien wie auch das aminogruppenspezifische Reagenz TNBS mit dem gleichen Lysinrest des Translokators reagieren. Zudem kann aus diesen Experimenten geschlossen werden, daß auch die Transporthemmung durch DABS über eine Reaktion mit diesem Lysinrest verläuft.

Die Transporthemmung auf Grund einer Reaktion mit lysinspezifischen Reagenzien kann unterschieden werden von der Hemmung, die nach Inkubation mit Butandion und Phenylglyoxal zu beobachten ist. Diese Reagenzien setzen die Transportaktivität durch eine Modifizierung eines Argininrestes herab.

4.3. Funktion und Lokalisation der reaktiven Aminosäurereste

4.3.1. Vorbemerkungen

Oftmals wird in der Literatur aus dem Befund, daß die Aktivität einer enzymatischen Reaktion durch ein aminosäurespezifisches Reagenz inhibiert wird, auf die Beteiligung dieses Restes auch an der katalytischen Funktion geschlossen. Dieser Schluß ist jedoch unzulässig, da, wie in der Einleitung ausgeführt, die katalytische Aktivität auch durch die Modifizierung eines Aminosäurerestes außerhalb des aktiven Zentrums über sterische oder elektrostatische Einflüsse herabgesetzt werden kann. Das aktive Zentrum ist jedenfalls der Ort, an dem die Substrate mit spezifischen Aminosäureresten eines Proteins in Wechselwirkung treten. Daher wurde versucht, über Substratschutzexperimente gegenüber einer Inhibitorreaktion zu einer Aussage bezüglich der Lokalisation und Funktion der identifizierten Aminosäurereste, der SH-, Lysin- und Arginingruppe, zu kommen. In allen Fällen, in denen der Einfluß von Substraten auf die Transporthemmung durch Inhibitoren gemessen werden sollte, wurde der Effekt von 2-PGA ebenfalls geprüft. 2-PGA weist im Vergleich zu 3-PGA bei ansonsten annähernd gleicher Ladungsverteilung eine 20fachniedrigere Affinität zum Phosphattranslokator auf (Fliege et al. 1978). Es eignet sich daher als Kontrollsubstanz, um auf diese Weise elektrostatische Effekte auf Grund unspezifischer Wechselwirkungen zwischen Phosphat bzw. 3-PGA und dem Trans-

lokator auszuschalten. Sind die Schutzeffekte durch Phosphat und 3-PGA ähnlich hoch wie der für 2-PGA gemessene, wird der Schutz als "unspezifisch" bezeichnet.

Eine weitere Überlegung ist der Betrachtung solcher Ergebnisse voranzustellen.

Da die Wechselwirkung zwischen dem Substrat und dem Translokator elektrostatischer Natur sind, das Substrat also im Gegensatz zu den irreversibel reagierenden Inhibitoren von seinem Bindungsort wegdifundieren kann, geht in den Schutzeffekt stets noch ein Zeitfaktor mit ein. Ein signifikanter Schutzeffekt ist daher nur bei kurzen Inkubationszeiten mit dem Inhibitor festzustellen, wenn der Effekt auf die Verlangsamung der Hemmrates durch hohe Konzentrationen an Substrat noch erfaßbar ist. Andererseits aber brauchen manche Inhibitoren eine gewisse Zeit, um überhaupt wirken zu können.

4.3.2. Funktion und Lokalisation der SH-Gruppe

In Abb. 10 wurde gezeigt, daß der Phosphattransport gehemmt wird durch die Modifizierung der SH Gruppe des Translokators mit DTNB zu einer S-TNB Gruppe. Auf Grund der guten Abgangsreaktivität des TNB-Restes eignet sich dieses gemischte Disulfid zur Synthese weiterer Verbindungen. Durch die Reaktion mit dem nucleophilen Cyanidion kann die S-TNB in eine S-CN Gruppe überführt werden (Vanaman und Stark 1970, DerTerrossian und Kassab 1976, O'Neal und Fisher 1977). Die Einführung dieser kleinen Gruppe erlaubt eine bessere Beurteilung der funktionellen

Eigenschaften der fraglichen SH-Gruppe. Wäre die Transportkatalyse auf die Intaktheit der SH-Gruppe angewiesen, sollte der Transport auch nach dieser Modifizierung inaktiviert bleiben. Es zeigte sich jedoch, daß das S-CN Derivat des Translokators im Vergleich zur Kontrolle fast vollständig aktiv ist (Abb. 10). Daraus kann geschlossen werden, daß die SH-Gruppe des Translokators an der Katalyse nicht beteiligt ist. Die katalytische Aktivität des Translokators geht demnach auf Grund der Einführung des voluminösen TNB-Restes verloren, da der Austausch dieses Restes gegen die kleine Cyanogruppe zu einer Reaktivierung führt.

Die Möglichkeit, daß die SH-Gruppe, obgleich nicht funktionell, im aktiven Zentrum lokalisiert ist, kann damit jedoch nicht ausgeschlossen werden. Daher wurden Experimente durchgeführt, um den Einfluß der Substrate auf die Hemmung durch pCMS und NEM zu messen. Gegenüber der Hemmung durch pCMS besitzen die Substrate 3-PGA und Phosphat nur einen geringen spezifischen Schutzeffekt (Tabelle IV). Dies weist auf eine Lokalisation der fraglichen SH-Gruppe außerhalb des aktiven Zentrums hin. Es ist, wie ausgeführt, vorstellbar, daß auch das voluminöse SH-Reagenz pCMS nicht durch eine Bindung direkt an das aktive Zentrum, sondern durch eine Reaktion außerhalb des Zentrums und einer damit verbundenen möglichen Konformationsänderung des Proteins die Aktivität des Translokators herabsetzt.

Demgegenüber weisen die Substrate Phosphat und 3-PGA einen deutlichen Schutzeffekt gegenüber der Hemmung durch

NEM auf (Tab. V). Dies spricht für eine Lokalisation der SH-Gruppe im aktiven Zentrum. Mit 2-PGA wird der Hemmeffekt durch NEM vergrößert - ein Ergebnis, das zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklärt werden kann.

Die Widersprüchlichkeit dieser Ergebnisse kann wie folgt diskutiert werden:

a) pCMS und NEM reagieren mit der gleichen im aktiven Zentrum lokalisierten SH-Gruppe, die jedoch nicht funktionell ist. Der fehlende Schutzeffekt gegenüber der Hemmung durch pCMS ließe sich, wie oben aufgeführt, dadurch erklären, daß bis zum Zeitpunkt der Messung schon zuviel pCMS mit der SH-Gruppe des Translokators reagiert und damit aus dem Gleichgewicht des Translokators mit dem Substrat entfernt hat, um die Messung eines Schutzeffektes zu ermöglichen.

b) pCMS und NEM reagieren mit verschiedenen Gruppen. Es ist vorstellbar, daß die mit pCMS und DTNB reagierende SH-Gruppe für NEM nicht zugänglich ist. Diese SH-Gruppe ist nicht funktionell und muß auf Grund des fehlenden Substratschutzes gegenüber der Hemmung mit pCMS außerhalb des aktiven Zentrums lokalisiert sein.

Wie unter 3.2.1. beschrieben, kann eine Transporthemmung durch NEM nur im alkalischen Bereich, zudem bei längerer Inkubationsdauer und höherer Temperatur festgestellt werden.

Es existieren in der Literatur verschiedene Hinweise darauf, daß solche Bedingungen die Reaktion zwischen NEM und Aminogruppen über eine N-Alkylierung begünstigen.

(Smyth et al. 1960, Riggs 1961, Brewer und Riehm 1967). Wie weiter unten ausgeführt, befindet sich der mit TNBS und PLP identifizierte Lysinrest im aktiven Zentrum des Translokators. Die Substratschutzexperimente fänden ihre Erklärung, reagierte NEM nicht mit der SH-Gruppe, sondern mit diesem Lysinrest. Der Schutzeffekt durch pCMS vor der NEM Hemmung (Abb. 11) müßte dann so erklärt werden, daß durch eine Konformationsänderung auf Grund der Bindung von pCMS an die SH-Gruppe der Lysinrest des aktiven Zentrums für NEM nicht mehr zugänglich wird. Dies sollte dann auch für die lysinspezifischen Reagenzien PLP und TNBS gelten. Tatsächlich konnte unter 3.4.4. gezeigt werden, daß das SH-Reagenz pCMS den Translokator teilweise vor der Reaktion mit PLP und TNBS zu schützen vermag. Zusammengekommen machen diese Befunde die ausgeführte zweite Erklärungsmöglichkeit wahrscheinlicher.

4.3.3. Funktion und Lokalisation des Lysin- und Argininrestes

Wie beschrieben, kann die Aktivität des Translokators sowohl über die Modifizierung eines Lysinrestes mit PLP, TNBS, PAL und DABS als auch über die Reaktion eines Argininrestes mit Phenylglyoxal und Butandion gehemmt werden. Aus den Substratschutzexperimenten gegenüber der Hemmung durch diese Inhibitoren (Tabellen VI, VIII, IX, XIII und XVII) läßt sich sowohl dem Lysin- als auch dem Argininrest eine Funktion bei der Substratbindung zuweisen. Beide Aminosäurereste sind daher im aktiven Zentrum des

Phosphattranslokators lokalisiert.

Die Anwesenheit zweier kationischer Gruppen im aktiven Zentrum wird verständlich, wenn man berücksichtigt, daß die Substrate des Transportsystems als zweifach negativ geladene Ionen transportiert werden (Fliege et al. 1978).

Energie für die Substratbindung sollte daher über eine Wechselwirkung mit zwei positiv geladenen Aminosäuren wie Lysin und Arginin zur Verfügung gestellt werden.

Die Modifizierung des Argininrestes mit PGO (Abb. 42) einerseits und die des Lysinrestes mit TNBS (Abb. 36) und PAL (Abb. 27) andererseits führen zu einer nicht-kompetitiven Hemmung des Transports. Im Gegensatz dazu erweist sich PLP als ein kompetitiver Inhibitor des Phosphattransports. Die Hemmung des Transports durch PLP ist jedoch zeitabhängig und erreicht bei einer gegebenen PLP Konzentration nach einer bestimmten Zeit einen Endwert. Augenscheinlich reflektiert die Zeitabhängigkeit der Transporthemmung die Bindung von PLP an den Translokator. Es kann nicht entschieden werden, ob die Kinetik durch die Bildung der Schiffschen Base oder durch einen Diffusionsschritt des PLP an das aktive Zentrum des Translokators bedingt wird. Das kompetitive Hemmverhalten ist jedoch erst nach erfolgter Bindung an den Lysinrest als der einen Substratbindungsstelle festzustellen. Es kann dadurch erklärt werden, daß der Phosphatrest des PLP mit dem Substrat Phosphat um die zweite Bindungsstelle, den Argininrest, kompetitiert. Demnach hat also die durch PLP bedingte Transporthemmung eine zweifache Ursache. Zuerst erfolgt die

Bindung an das aktive Zentrum über die Ausbildung einer Schiffschen Base zwischen der Aldehydfunktion und einem Lysinrest des Translokators. Diese Bindung ist die Voraussetzung dafür, daß die Phosphatgruppe des PLP mit den Substraten des Translokators um die Bindung an einen Argininrest als zweite Substratbindungsstelle kompetieren kann.

Die Bindung von PLP an den Translokator ist, wie durch einen K_i Wert von 40 μM belegt wird, relativ fest und liegt damit um eine Größenordnung über der Affinität des Phosphats (K_M (Phosphat) = 0.3 mM, Fliege et al. 1978) und um zwei Größenordnungen über der Affinität von PAL zum Translokator (K_i (PAL) = 2.5 mM). Auch dies weist auf den zusätzlichen Einfluß der chemischen Bindung des PLP an den Translokator über die Schiffsche Base hin.

4.4. Die Identifizierung des Phosphattranslokators

4.4.1. Vorbemerkungen

Werden Inhibitoren, die kovalent und irreversibel reagieren, in ihrer radioaktiven Form eingesetzt, können sie zur Markierung und möglichen Identifizierung des untersuchten Proteins verwendet werden. Soll, wie im vorliegenden Fall, eine einzige Proteinkomponente der Membran identifiziert werden, wird die Einsatzmöglichkeit für einen Inhibitor durch seine Spezifität gegenüber der zu identifizierenden Membrankomponente bestimmt. So ist z.B. Carboxyattractylat ein absolut spezifischer Hemmer des mitochondrialen ATP/ADP Translokators. Dieses Transportsystem konnte durch den Ein-

satz des markierten Inhibitors identifiziert und isoliert werden (Riccio et al. 1975 a, b).

Für das Phosphattransportsystem der Hüllmembran jedoch war ein solch spezifischer Inhibitor bislang nicht bekannt. Zur radioaktiven Markierung des Translokators war man daher auf den Einsatz der beschriebenen Inhibitoren des Transports angewiesen. Auch wenn die eingesetzten Transportinhibitoren teilweise über eine Reaktivität gegenüber nur einem bestimmten Aminosäurerest verfügen, war nicht zu erwarten, daß diese Reagenzien über eine Spezifität gegenüber dem Phosphattransportsystem als nur einer Komponente der Hüllmembran verfügen. Werden also von der Markierung mit einem Inhibitor des Phosphattranslokators erwartungsgemäß mehrere Membranpolypeptide erfaßt, ist man für eine Identifizierung auf weitere Informationen angewiesen. So können die Ergebnisse der Markierungsexperimente mit denen aus den entsprechenden Transportuntersuchungen korreliert werden. Es gelang auf diese Weise, den Phosphattranslokator durch die Markierungen mit $[^3\text{H}]\text{NEM}$, $[^{35}\text{S}]\text{DABS}$, $\text{PLP}/[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ und $\text{TNBS}/[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ eindeutig zu identifizieren. Die Ergebnisse der jeweiligen Markierungsexperimente werden im Folgenden diskutiert.

4.4.2. Markierung der Hüllmembran mit $[^3\text{H}]\text{NEM}$

Das Markierungsmuster des direkten Einbaues von $[^3\text{H}]\text{NEM}$ in die Hüllmembran zeigt, daß dieses SH-Reagenz unspezifisch mit den Membranpolypeptiden reagiert. Bei einer Konzentration von 2 mM $[^3\text{H}]\text{NEM}$ - ausreichend für eine signi-

fikante Hemmung des Phosphattransports - werden mindestens 8 Polypeptide der Membran (I-VIII) markiert. Daher wurde versucht, die Spezifität des NEM Einbaus zu erhöhen. Hierzu wurde der experimentelle Befund zugrunde gelegt, daß pCMS vor der Hemmung durch NEM zu schützen vermag. Im Gegensatz zu NEM erweist sich pCMS bezüglich der Reaktion mit SH-Gruppen in Proteinen als reversibler Inhibitor. Das gilt auch für die SH-Gruppe des Translokators, die nach der Reaktion mit pCMS durch eine Inkubation mit dem Thiol DTT wieder freigesetzt werden konnte. Der Phosphattransport wurde so fast vollständig reaktiviert (Abb. 11). Wurde pCMS eingesetzt, um zuerst die SH-Gruppe des Phosphattranslokators zu besetzen, konnten anschließend mit kaltem NEM Sulfhydrylgruppen von denjenigen Membranproteinen blockiert werden, die keine Beziehung zum Phosphattransportsystem aufweisen, bzw. die ebenfalls durch pCMS vor dem Angriff durch NEM geschützt werden. Die nachfolgende Inkubation mit DTT bewirkte eine Reaktivierung der Translokator SH-Gruppe, die nun mit $[^3\text{H}]$ NEM radioaktiv markiert werden konnte (Abb. 13). Von dieser Markierung werden außer dem Phosphattransportsystem noch diejenigen Membranproteine erfaßt, die ebenfalls mit pCMS vor der Reaktion mit NEM geschützt werden können. Für alle übrigen Membranpolypeptide ist $[^3\text{H}]$ NEM auf Grund der vorausgegangenen Inkubation mit kaltem NEM nicht zugänglich. Mit dieser "Markierung nach pCMS/DTT Vorbehandlung" wurde gegenüber der Kontrollmarkierung ein um den Faktor 2.4 niedriger Einbau von Radioaktivität in die Gesamtmembran-

fraktion erreicht. Durch diese Vorbehandlung konnte die Spezifität für den Einbau von NEM beträchtlich erhöht werden. Die Markierung erscheint vorzugsweise nur noch in zwei Membranproteinen, Polypeptid VI und VIII. Vornehmlich werden also diese beiden Membranpolypeptide, wie für den Phosphattranslokator belegt, durch pCMS vor der Reaktion mit NEM geschützt.

Um weitere Hinweise auf die Identität des Transportsystems zu erhalten, wurde für steigende NEM Konzentrationen die Bindung von $[^3\text{H}]\text{NEM}$ an die Membrankomponenten I bis VIII gemessen und mit der Hemmung des Phosphattransports durch die jeweilige NEM Konzentration korreliert (Abb. 15). Eine eindeutige Korrelation ergab sich nur für das Membranpolypeptid VIII.

Dies gibt den ersten Hinweis darauf, daß es sich bei diesem Membranpolypeptid um das Phosphattransportsystem handelt. Wie unter 3.1.2. ausgeführt, besitzt dieses Polypeptid ein Molekulargewicht von 29 000 Dalton und ist mit einem Anteil von 20 % am Gesamtmembranprotein das Hauptpolypeptid der Hüllmembran.

4.3.3. Markierung der Hüllmembran mit $[^{35}\text{S}]\text{Diazobenzo-$
sulfonsäure, Pyridoxal 5'-phosphat/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ und
2,4,6-Trinitrobenzo-sulfonsäure/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$

Wie unter 3.4.4. gezeigt, modifizieren Diazobenzo-sulfonsäure (DABS), Pyridoxal 5'-phosphat (PLP) und 2,4,6-Trinitrobenzo-sulfonsäure (TNBS) den gleichen Lysinrest des Translokators. Die Ergebnisse der Markierungen mit diesen

Inhibitoren werden daher zusammengefaßt diskutiert.

DABS kann auf Grund seiner hydrophilen Eigenschaften zur Lokalisation von Proteinen der Membranaußenseite herangezogen werden. Dieses Reagenz wurde z.B. eingesetzt zur Markierung der inneren Mitochondrienmembran (Tinberg et al. 1974), zur Lokalisation der Untereinheiten der Hefe Cytochrom Oxidase (Eytan und Schatz, 1974) oder zur Markierung von Photosystem I und II (Dilley et al. 1972).

Auch PLP ist als Phosphatester für biologische Membranen impermeabel. Seine Reaktivität bleibt daher auf solche Proteine beschränkt, die, wie der Phosphattranslokator, von der Außenseite der Membran zugänglich sind. PLP reagiert als aminosäurespezifisches Reagenz mit Lysinresten in Proteinen unter Ausbildung einer Schiffischen Base, die mit NaBH_4 leicht reduziert werden kann. Der Einsatz von $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ erlaubt es, so auf einfache Weise eine radioaktive Markierung in das Protein einzuführen.

Ein weiteres lysinspezifisches Reagenz, TNBS, erwies sich als potenter Inhibitor des Phosphattransports. Eine Markierung der Hüllmembran und damit des Transportsystems gelang über die Reduktion des Trinitrophenylrestes mit radioaktivem $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$.

Die Polypeptide der Hüllmembran werden durch die genannten Reagenzien unterschiedlich markiert.

Als radioaktive Verbindung eingesetzt, erfaßt $[^{35}\text{S}]\text{DABS}$ fast sämtliche Membranpolypeptide. Das größte Membranpolypeptid mit einem Molekulargewicht von 29 000 Dalton und einem Anteil von ca. 20 % am Gesamtmembranprotein

wird jedoch am stärksten markiert (Abb. 19). Hingegen sind die Markierungen mit PLP/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ und TNBS/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ sehr spezifisch: die Radioaktivität wird vorzugsweise nur in das 29 000 Dalton Protein eingebaut (Abb. 30 und 38). Aus dieser selektiven Markierung und auf Grund der Tatsache, daß die beschriebene Transporthemmung durch PLP und TNBS die Bindung dieser Reagenzien an den Translokator reflektiert, kann bereits geschlossen werden, daß das markierte 29 000 Dalton Polypeptid mit dem Phosphattranslokator identisch ist. Für PLP besteht zudem eine Korrelation zwischen der Kinetik der Transporthemmung und der Kinetik für den Einbau dieses Inhibitors in das 29 000 Dalton Protein (Abb. 31).

Weitere Hinweise auf die Identität des Phosphattransportsystems können aus den Untersuchungen der Substrateffekte auf die Markierungen mit DABS, PLP und TNBS erhalten werden. Mit den in den Tabellen VI, VIII und XIII dargestellten Experimenten wurde gezeigt, daß die Substrate des Phosphattranslokators 3-PGA und Phosphat einen spezifischen Schutzeffekt gegenüber der Hemmung des Transports durch DABS, PLP und TNBS aufweisen. Die gleichen Effekte lassen sich auch bezüglich des Einbaues dieser Inhibitoren in das 29 000 Dalton Protein zeigen (Tabellen VII, X und XIV). Durch 3-PGA und Phosphat werden die jeweiligen Markierungen dieses Proteins spezifisch herabgesetzt. Im Fall der Markierungen mit PLP und TNBS zeigt sich dieser Substratschutzeffekt für das spezifisch markierte Membranprotein, das 29 000 Dalton Polypeptid. Bei den Experimenten mit

DABS, durch das mehrere Membranproteine markiert werden, ist dieser Effekt allein für das 29 000 Dalton Protein nachweisbar.

Dies belegt eindeutig, daß das 29 000 Dalton Membranpolypeptid das Phosphattransportsystem repräsentiert.

4.4.4. Zur Asymmetrie der Hüllmembran.

Einem impermeablen Reagenz wie PLP sind nur die Polypeptide der Membranaußenseite zugänglich. Dies setzt allerdings voraus, daß die Membran tatsächlich unversehrt ist. Um zu gewährleisten, daß nur die Hüllmembran intakter Chloroplasten für die weitere Aufarbeitung verwendet werden, erfolgte, wie unter 2.4.2. beschrieben, nach der sich der Inkubation mit PLP anschließenden Zugabe von markiertem $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ ein Waschschrift. Dadurch wurden die bereits geschockten Chloroplasten abgetrennt und die Markierung mit PLP beschränkte sich daher auf die nur von der Außenseite der Membran her zugänglichen Proteine.

In einem solchen Fall wurde PLP vorzugsweise nur in das 29 000 Dalton Membranprotein eingebaut (Abb. 30). Wurde jedoch auch die dem Stroma zugewandte Innenseite der Membran für PLP zugänglich gemacht, konnte PLP auch in andere Membranproteine eingebaut werden (Abb. 32). Auf den beiden Seiten der Membran sind also verschiedene Proteine für PLP zugänglich und damit markierbar. Die Hüllmembran weist somit bezüglich der Proteinausstattung eine Asymmetrie auf.

Diese asymmetrische Verteilung der Membrankomponenten,

experimentell erstmals für die Erythrozytenmembran nachgewiesen (Bretscher und Raff 1975), steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß durch die Hüllmembran zwei voneinander verschiedene wässrige Kompartimente, Cytosol und Stroma, mit verschiedenen metabolischen Funktionen getrennt werden.

4.4.5. Proteinchemische Daten des Phosphattranslokators

Mit den vorliegenden Ergebnissen wurde der Phosphattranslokator als das 29 000 Dalton Protein der Hüllmembran identifiziert. Betrachtet man zusammenfassend die Ergebnisse aus den Markierungsexperimenten und den Transportmessungen, können quantitative Aussagen über die Bindungen zwischen dem Translokator und den Inhibitoren DABS bzw. NEM und weitergehend über die Wechselzahl des Transportsystems erhalten werden. Die Bindungen von PLP und TNBS, die über den Einbau von $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ gemessen wurden, erlauben dagegen keine quantitativen Aussagen. Dies liegt einerseits im Isotopeneffekt des Tritiums begründet, und kann andererseits auf die Instabilität der radioaktiven Borhydridlösung zurückgeführt werden.

Aus kinetischen Daten konnte geschlossen werden, daß die Hemmung des Phosphattransports durch DABS über eine 1:1 Bindung zwischen diesem Reagenz und einem Lysinrest im aktiven Zentrum des Translokators erfolgt. Diese 1:1 Bindung steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die aus den Bindungsstudien von $[^{35}\text{S}]\text{DABS}$ an das 29 000 Dalton Protein erhalten wurden. Hieraus berechnet sich

die maximale Bindung zu 30.0 nMol/mg 29 000 Dalton Protein bzw. 0.87 Mol/Mol dieses Proteins. Diesen Werten liegt ein prozentualer Anteil des Phosphattranslokators von 20 % am Gesamtmembranprotein zu Grunde, der über die Farbintensität dieser Bande abgeschätzt wurde. Die Übereinstimmung der kinetischen Daten und der Bindungsstudien belegen auf der einen Seite die Brauchbarkeit dieser Abschätzung und zeigen andererseits, daß dieses Protein größtenteils einheitlich sein muß.

Die Bindungsstudien mit $[^3\text{H}]\text{NEM}$ liefern ein quantitativ vergleichbares Ergebnis. Legt man einen 20 %igen Anteil des Phosphattranslokators am Gesamtmembranprotein zu Grunde, kann die maximale Bindung von NEM an das Transportsystem zu 36 nMol/mg 29 000 Dalton Protein bestimmt werden. Dies entspricht einer Bindung von 1.04 Mol NEM/Mol Translokator und bedeutet, daß auch die Hemmung des Phosphattransports mit NEM durch die Blockierung nur einer für NEM zugänglichen Gruppe inaktiviert wird.

Die maximale Bindung für DABS bzw. NEM ist auf das Protein der gesamten Hüllmembran, d.h. äußerer und innerer Membran, bezogen, während das Transportsystem jedoch nur der inneren Hüllmembran, die bislang nicht von der äußeren getrennt werden konnte, zugeordnet wird. Die Werte für die tatsächlichen Bindungen an die funktionelle innere Membran können also höher liegen. Da sich aber die Abschätzungen des 20 %igen Anteils des Phosphattranslokators am Gesamtmembranprotein ebenfalls auf beide Membranen bezieht, wird durch den Bezug der maximalen Bindungen für DABS und

NEM auf den 20 %igen Anteil des Transportsystems ein möglicher Fehler korrigiert. Dies wird auch dadurch bestätigt, daß sich auf diese Weise für beide Inhibitoren eine 1:1 Bindung an den Translokator ergibt.

Aus dem gemittelten Wert für die maximale Bindung von DABS bzw. NEM von 33 nMol/mg Translokatorprotein kann die Wechselzahl des Transportsystems bestimmt werden. Mit einem 20 %igen Anteil des Translokatorproteins am Membranprotein und den Daten aus Tabelle I für den Anteil des Membranproteins am Gesamtprotein von 0.8 % und dem Protein/Chlorophyll Verhältnis von 18 ergibt sich eine Translokatorkonzentration von 0.95 nMol/mg Chlorophyll. Mit dem Wert für die maximale Geschwindigkeit des Translokators ($V_{\max} = 57 \mu\text{Mol (mg Chl.} \cdot \text{h)}^{-1}$ bei 4°C , Fliege et al. 1978) kann daraus die molekulare Aktivität zu 1000 min^{-1} (4°C) berechnet werden.

Dieser Wert liegt zwischen denen zweier mitochondrialer Transportsysteme. Für den Adeninnucleotid- bzw. Phosphat/ OH^{-} Translokator wurden Werte von 550 min^{-1} bei 21°C (Klingenberg 1975) bzw. $3\ 500 \text{ min}^{-1}$ bei 0°C (Coty und Pedersen 1975) bestimmt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Phosphattranslokator ist in der inneren Hüllmembran des Chloroplasten lokalisiert und katalysiert im Gegen-tausch mit Phosphat den Austransport von Triosephosphaten und 3-PGA als den Produkten der CO_2 -Fixierung. Er ist damit ein entscheidendes Verbindungsglied zwischen dem Stroma-raum und dem Cytosol. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Beschreibung der Natur seiner Substratbindungsstellen und seine Identifizierung als einer Komponente der Hüll-membran.

Dies wurde erreicht durch den Einsatz gruppenspezifischer und irreversibel reagierender Agenzien, deren Einfluß auf die Aktivität des Transportsystems untersucht wurde.

Die Aktivität des Translokators kann durch eine Reihe von SH-Reagenzien gehemmt werden, woraus das Vorhandensein ei-ner reaktiven SH-Gruppe gefolgert werden kann. Es zeigte sich jedoch, daß diese SH-Gruppe an der Katalyse des Sub-strattransports nicht beteiligt und zudem nicht im aktiven Zentrum lokalisiert ist. Die Hemmung der katalytischen Aktivität des Translokators durch SH-Reagenzien wird dem-nach durch eine indirekte sterische oder elektrostatische Beeinflussung des aktiven Zentrums infolge einer Modifi-zierung der SH-Gruppe verursacht.

Mit Hilfe weiterer aminosäurespezifischer Reagenzien konn-ten zwei Aminosäurereste, ein Lysin- und ein Argininrest im aktiven Zentrum des Translokators identifiziert werden. Die Anwesenheit zweier kationischer Gruppen wird verständ-

lich, wenn man berücksichtigt, daß die Substrate des Phosphattranslokators, Dihydroxyacetonphosphat, 3-Phosphoglycerinsäure und Phosphat in einer zweifach negativ geladenen Form transportiert werden. Die Energie für die Substratbindung sollte daher durch die Wechselwirkung mit zwei positiv geladenen Aminosäureresten im aktiven Zentrum des Translokators bereitgestellt werden. Pyridoxal 5'-phosphat, das über den Lysinrest im aktiven Zentrum an den Translokator gebunden wird, hemmt die Transportaktivität zusätzlich, indem es über seine Phosphatgruppe mit dem Substrat Phosphat um die Bindung an die zweite Substratbindungsstelle, den Argininrest, kompetiert.

Mit Pyridoxal 5'-phosphat, dessen Impermeabilität belegt werden konnte, kann zudem über eine gezielte Reaktion mit dem Translokator in den Prozeß der CO_2 -Fixierung eingegriffen werden.

Weiter konnte gezeigt werden, daß diesem Reagenz auf den beiden Seiten der Hüllmembran verschiedene Polypeptide zugänglich sind, daß die Hüllmembran also bezüglich der Verteilung der Membrankomponenten asymmetrisch ist. Diese Asymmetrie steht in Übereinstimmung mit der Tatsache, daß durch die Hüllmembran zwei voneinander verschiedene Kompartimente, Cytosol und Stroma, mit verschiedenen metabolischen Funktionen getrennt werden.

Durch den Einsatz radioaktiv markierter Inhibitoren des Transports, $[^3\text{H}]\text{N}$ -Äthylmaleinimid, $[^{35}\text{S}]\text{Diazobenzoessulfonsäure}$, Pyridoxal 5'-phosphat/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$ und 2,4,6-Trinitrobenzoessulfonsäure/ $[^3\text{H}]\text{NaBH}_4$, konnte die Translokator Akti-

vität eindeutig einer einzigen Membrankomponente zugewiesen werden. Das den Phosphattranslokator repräsentierenden Membranpolypeptid weist ein Molekulargewicht von 29 000 Dalton auf und ist mit einem Anteil von 20 % am Gesamtmembranprotein das Hauptpolypeptid der Hüllmembran. Die Markierung mit $[^3\text{H}]\text{N}$ -Äthylmaleinimid und $[^{35}\text{S}]\text{Diazo}$ -benzoesulfonsäure erfaßten jeweils mehrere Membranpolypeptide. Eine Identifizierung des Translokators konnte hier durch eine Korrelation der Ergebnisse aus den Markierungsexperimenten mit denen aus den entsprechenden Transportuntersuchungen erreicht werden. Dagegen reagierten Pyridoxal 5'-phosphat und 2,4,6-Trinitrobenzoesulfonsäure ausschließlich mit dem 29 000 Dalton Polypeptid und erwiesen sich somit für den Phosphattranslokator als spezifische Markierungsreagenzien.

Die Konzentration des Phosphattransportsystems konnte zu 0.95 nMol/mg Chlorophyll bestimmt werden und seine molekulare Aktivität errechnete sich zu 1000 min^{-1} .

6. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Chl.	Chlorophyll
DABS	Diazobenzoessulfonsäure
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DTNB	2,2'-Dinitro-5,5'-dithiodibenzoessäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Äthylendiamin-tetraacetat
FBP	Fructosebisphosphat
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-piperazinyl-(1)]-äthansulfonsäure
HMP	Hexosemonophosphat
NEM	N-Äthylmaleinimid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAL	Pyridoxal
pCMS	p-(Chlormercuri)-benzoessulfonsäure
2-PGA	2-Phosphoglycerinsäure
3-PGA	3-Phosphoglycerinsäure
PGO	Phenylglyoxal
P _i	anorganisches Phosphat
PLP	Pyridoxal 5'-phosphat
PMP	Pentosemonophosphat
RuBP	Ribulosebisphosphat
SDS	Natriumlaurylsulfat
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzoessulfonsäure
TRICINE	N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Adams, M.J., Buehner, M., Chandrasekhar, K., Ford, G.C., Hackert, M.L., Liljas, A., Rossmann, M.G., Smiley, I.E., Allison, W.S., Everse, J., Kaplan, N.O. und Taylor, S.S. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 1968-1972
- 2 Basch, R.S. (1968) Analyt. Biochem. 26, 185-188
- 3 Borders, C.L., Jr. und Riordan, J.F. (1975) Biochemistry 14, 4699-4704
- 4 Boxer, D.H. (1975) FEBS Lett. 59, 149-152
- 5 Bretscher, M.S. und Raff, M.C. (1975) Nature 258, 43-48
- 6 Brewer, C.F. und Riehm, J.P. (1967) Analyt. Biochem. 18, 248-255
- 7 Cabantchik, I.Z., Balshin, M., Breuer, W. und Rothstein, A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5130-5136
- 8 Cockburn, W., Baldry, C.W. und Walker, D.A. (1967) Biochim. Biophys. Acta 143, 614-642
- 9 Cockburn, W., Walker, D.A. und Baldry, C.W. (1968) Biochem. J. 107, 89-95
- 10 Cooper, D. und Reich, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3008-3013
- 11 Coty, W.A. und Pedersen, P.L. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3515-3521
- 12 Der Terrossian, E. und Kassab, R. (1976) Eur. J. Biochem. 70, 623-628
- 13 Dilley, R.A., Peters, G.A., Shaw, E.R. (1972) J. Membr. Biol. 8, 163-180

- 14 Douce, R., Holtz, R.B. und Benson, A.A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 7215-7222
- 15 Eytan, G.D. und Schatz, G. (1974) J. Biol. Chem. 250, 767-774
- 16 Fliege, R., Flügge, U.I., Werdan, K. und Heldt, H.W. (1978) Biochim. Biophys. Acta 502, 232-247
- 17 Flügge, U.I. und Heldt, H.W. (1976) FEBS Lett. 68, 259-262
- 18 Flügge, U.I. und Heldt, H.W. (1977a) FEBS Lett. 82, 29-33
- 19 Flügge, U.I. und Heldt, H.W. (1977b) Z. Physiol. Chemie 358, 232
- 20 Flügge, U.I. und Heldt, H.W. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 37-44
- 21 Forti, G. (1971) Methods Enzymol. 23, 447-451
- 22 Gregory, J.D. (1955) J. Am. Chem. Soc. 77, 3922-3923
- 23 Hadvary, P. und Kadenbach, B. (1976) Eur. J. Biochem. 67, 573-581
- 24 Heber, U. und Santarius, K.A. (1970) Z. Naturforsch. 25 b 718-728
- 25 Heldt, H.W. und Klingenberg, M. (1967) Methods Enzymol. 10, 482-487
- 26 Heldt, H.W. und Rapley, L. (1970) FEBS Lett. 10, 143-148
- 27 Heldt, H.W. und Sauer, F. (1971) Biochim. Biophys. Acta 234, 83-91
- 28 Heldt, H.W., Portis, A.R., Lilley, R.McC., Mosbach, A. und Chon, C.J. (1978) Planta, zur Veröffentlichung eingereicht.

- 29 Higgins, H.G., Harrington, K.L. (1959) Arch. Biochem. Biophys. 85, 409-425
- 30 Howard, A.N. und Wild, F. (1957) Biochem. J. 65, 651-659
- 31 Klingenberg, M. und Pfaff, E. (1967) Methods Enzymol. 10, 680-684
- 32 Klingenberg, M. (1975) in "The Enzymes of Biological Membranes: Membrane Transport", Vol.3, Hrsg. Martonosi, A.N.; Plenum Publ. Corp. New York/London-S. 383-438
- 33 Krämer, R. und Klingenberg, M. (1977 a) Biochemistry 16, 4954-4961
- 34 Krämer, R. und Klingenberg, M. (1977 b) FEBS Lett. 82, 363-367
- 35 Krämer, R., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1977) Biochemistry 16, 4949-4953
- 36 Lange, L.G., III, Riordan, J.F. und Vallee, B.L. (1974) Biochemistry 13, 4361-4370
- 37 Lehner, K. und Heldt, H.W. (1978) Biochim. Biophys. Acta 501, 531-544
- 38 Levy, H.M., Leber, P.D. und Ryan, E.M. (1963) J. Biol. Chem. 238, 3654-3659
- 39 Lilley, R.McC. und Walker, D.A. (1974) Biochem. Biophys. Acta 358, 226-229
- 40 Lilley, R.McC., Chon, C.J., Mosbach, A. und Heldt, H.W. (1977) Biochim. Biophys. Acta 460, 259-272
- 41 Lineweaver, H. und Burk, D. (1934) J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666

- 42 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275
- 43 Mackender, R.O. und Leech, R.M. (1974) Plant Physiol. 53, 496-502
- 44 Maddy, A.H. (1964) Biochim. Biophys. Acta 88, 390-399
- 45 Marcus, F., Schuster, S.M. und Lardy, H.A. (1976) J. Biol. Chem. 251, 1775-1780
- 46 McIntosh, J.E.A. (1968) Biochem. J. 109, 203-207
- 47 Metzler, D.E. und Snell, E.E. (1955), J. Am. Chem. Soc. 77, 2431-2437
- 48 Murphy, A.J. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 180, 114-120
- 49 Neville, D.M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6328-6334
- 50 Okuyama, T. und Satake, K. (1960) J. Biochem. Tokyo 47, 454-461
- 51 O'Neal, S.G. und Fisher, R.R. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4552-4556
- 52 Parker, A.J. und Kharash, N. (1960) J. Am. Chem. Soc. 82, 3071-3075
- 53 Parrot, C.L. und Shifrin, S. (1977) Biochim. Biophys. Acta 491, 114-120
- 54 Patthy, L. und Smith, E.L. (1975) J. Biol. Chem. 259, 565-569
- 55 Pauly, H.Z. (1904) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 42, 508-518
- 56 Paech, C., Ryan, F.J. und Tolbert, N.E. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 179, 279-288

- 57 Poincelot, R.P. (1973) Arch. Biochem. Biophys. 159,
134-142
- 58 Poincelot, R.P. und Day, P.R. (1974) Plant Physiol.
54, 780-783
- 59 Rasched, J., Jörnvall, H. und Sund, H. (1974) Eur.
J. Biochem. 41, 603-606
- 60 Riccio, P., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1975 a)
FEBS Lett. 56, 129-132
- 61 Riccio, P., Aquila, H. und Klingenberg, M. (1975 b)
FEBS Lett. 56, 133-138
- 62 Rifkin, D.B., Compans, R.W., Reich, E. (1972) J. Biol.
Chem. 247, 6432-6437
- 63 Riggs, A. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1948-1954
- 64 Riordan, J.F. (1973) Biochemistry 12, 3915-3923
- 65 Sabnis, D.D., Gordon, M. und Galston, A.W. (1970)
Plant Physiol. 45, 25-32
- 66 Singer, J.S. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 805-833
- 67 Smyth, D.G., Nagamatsu, A. und Fruton, J.S. (1960)
J. Am. Chem. Soc. 82, 4600-4604
- 68 Takahashi, K. (1968) J. Biol. Chem. 243, 6171-6179
- 69 Takahashi, K. (1977) J. Biochem. 81, 403-414
- 70 Tinberg, H.M., Melnick, R.L., Maguire, J., Packer, L.
(1974) Biochim. Biophys. Acta 345, 118-128
- 71 Vanaman, T.C. und Stark, G.R. (1970) J. Biol. Chem.
245, 3565-3573
- 72 Weber, K. und Osborn, M. (1969) J. Biol. Chem. 244,
4406-4412

- 73 Werdan, K. und Heldt, H.W. (1971) IIInd International Congress on Photosynthesis, Stresa, S. 1337-1343
- 74 Whatley, F.R. und Arnon, D.J. (1963) Methods Enzymol. 6, 308-313
- 75 Whitman, W. und Tabita, F.R. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 71, 1034-1039
- 76 Yang, P.C. und Schwert, G.W. (1972) Biochemistry 11, 2218-2224
- 77 Zeppezauer, E., Jönrvall, H. und Ohlsson, I. (1975) Eur. J. Biochem. 58, 95-104

LEBENS LAUF

Am 1. April 1948 wurde ich als zweites von drei Kindern des Dipl. Berging. Dr. Günther Flügge und seiner Frau Veronika, geb. Weber, in Aachen geboren.

1952 verlegten wir unseren Wohnsitz nach Dortmund, wo ich 1954 in die Volksschule eingeschult wurde.

Seit 1958 besuchte ich das humanistische Stadtgymnasium Dortmund; dort legte ich im Herbst 1966 die Reifeprüfung ab.

Nach der Ableistung einer 15monatigen Wehrdienstzeit nahm ich zum Sommersemester 1968 an der Universität Tübingen das Studium der Biochemie auf. Dieses Studium schloß ich Ende 1973 mit der Hauptdiplomprüfung und Ende 1974 mit der Diplomarbeit ab.

Von Januar 1975 bis Mai 1978 beschäftigte ich mich mit der vorliegenden Doktorarbeit.

